### **UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

Programa de doctorado: PATOLOGÍA QUIRÚRGICA, REPRODUCCIÓN HUMANA Y FACTORES PSICOLÓGICOS Y EL PROCESO DE ENFERMAR

Título de la Tesis

#### APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES AL ESTUDIO DE LA PARED DE **VENAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA VENOSA**

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> IRENE CASTAÑO GONZÁLEZ

Dirigida por el Dr. D. FRANCISCO ORTEGA SANTANA

Codirigida por la Dra. D<sup>a</sup>. BLANCA MOMPEÓ CORREDERA

Codirigida por el Dr. D. PABLO HERNÁNDEZ MORERA

El Director, La Codirectora, El Codirector,

La Doctoranda,

Las Palmas de Gran Canaria, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_



### Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Ciencias de la Salud Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

PROGRAMA: PATOLOGÍA QUIRÚRGICA, REPRODUCCIÓN HUMANA Y FACTORES PSICOLÓGICOS Y EL PROCESO DE ENFERMAR

### **TESIS DOCTORAL**

### APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES AL ESTUDIO DE LA PARED DE VENAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA VENOSA

Irene Castaño González

Las Palmas de Gran Canaria, 2015

A través de estas líneas desearía hacer público mi más profundo y sincero agradecimiento a las personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización del presente trabajo.

A mis directores de Tesis: Dr. Francisco Ortega, Dra. Blanca Mompeó y Dr. Pablo Hernández, por la guía, confianza y empuje que me han facilitado para la realización de este trabajo, así como la paciencia, preocupación y consideración que han tenido con mi vida personal y profesional, que en ciertos momentos ha retrasado la ejecución de algunas tareas.

Debo agradecer también el trabajo de las técnicas de laboratorio del departamento de Morfología de la ULPGC por su colaboración en el proceso de preparación de los cristales, en especial a Paqui (descanse en paz).

A aquellos compañeros de profesión que conocedores de mi empeño en finalizar este trabajo de investigación no han cejado en proporcionarme ánimo y facilidades que han hecho posible la conclusión de esta tesis.

Por último agradezco la ayuda y el apoyo moral de mi familia, por su colaboración y comprender la importancia que para mí tiene esta Tesis Doctoral. Su paciencia me ha permitido acometer profundos cambios en mi vida profesional y finalizar algunas tareas encasquilladas, siendo ésta una de ellas.

### Resumen

La enfermedad venosa crónica (EVC) es una de las afecciones más frecuentes en la población del mundo occidental y la patología más común de los vasos sanguíneos periféricos, englobando diversas entidades o categorías como las venas varicosas, la insuficiencia venosa crónica y las úlceras venosas. La EVC tiene una prevalencia alta, con valores infraestimados, que varían con la población estudiada.

A pesar de que la incidencia de la patología venosa es mucho más frecuente que la arterial en la práctica clínica, las enfermedades venosas han quedado relegadas a un segundo plano. La patogénesis de la enfermedad venosa crónica permanece poco aclarada hasta el momento.

Actualmente, el punto más aceptado en la patogénesis de la EVC es la etiología multifactorial, incluyendo la incompetencia valvular y el proceso del envejecimiento, señalando como punto de origen la debilidad de la pared vascular secundaria a la disfunción del músculo liso y al metabolismo inapropiado del tejido conjuntivo, resaltando la incompetencia valvular como secuela y no como causa primaria de la enfermedad varicosa. Estas últimas teorías se sustentan en el descubrimiento del perfil bioquímico de las venas varicosas potenciales que resulta similar al de las venas varicosas establecidas, mostrándose alteraciones en la pared previas al desarrollo de la incompetencia valvular.

En este trabajo se pretende aclarar si la alteración en la estructura y componentes de la pared venosa varicosa precede a la aparición del reflujo o si se desarrolla como consecuencia de aquél, haciendo uso de métodos cuantitativos y objetivos basados en el procesamiento de imágenes digitales.

Diferentes segmentos de venas safena interna procedentes de pacientes con EVC, sometidos a reflujo valvular (segmentos incompetentes) y sin reflujo valvular (segmentos competentes), seleccionados mediante ecografía doppler, han sido examinados, cuantificados y comparados. También se utilizaron segmentos sanos sin reflujo valvular como controles. Los objetivos de este trabajo fueron analizar las diferencias estructurales entre los distintos segmentos y con la zona anatómica de procedencia del segmento, analizar los diferentes componentes de la pared: fibras musculares, matriz extracelular y fibras elásticas, y estudiar la asociación de los parámetros analizados con la edad y el sexo de los sujetos.

Las principales aportaciones de la presente Tesis Doctoral se resumen en:

• Se plantean métodos que permiten la cuantificación objetiva de diferentes componentes estructurales de la pared venosa y marcadores inmunohistoquímicos mediante técnicas de procesado digital de las imágenes de las muestras.

- Se utilizan métodos estadísticos inferenciales basados en técnicas de remuestreo para el análisis de los datos numéricos obtenidos de la pared venosa, aplicables a tamaños muestrales pequeños. Además, la disponibilidad de pares de segmentos de sujetos diagnosticados de EVC permitió la realización de test estadísticos de muestras pareadas, evitando la interferencia de factores que varían entre los sujetos.
- Se analiza morfométricamente y morfológicamente la estructura de las capas constituyentes de la pared de la vena considerando la procedencia anatómica de los segmentos y sus características hemodinámicas, distinguiendo segmentos insuficientes competentes e incompetentes.
- Se ha realizado un análisis de correlación entre los parámetros medidos de la pared venosa y la edad y el sexo de los sujetos.

### Summary

Chronic venous disease (CVD) is one of the most common disorders among populations of Western countries and the most common pathology of peripheral blood vessel, encompassing various entities or categories like varicose veins, chronic venous insufficiency and venous ulcers. CVD has high prevalence rates, with underestimated values that vary depending upon the population studied.

A pesar de que la incidencia de la patología venosa es mucho más frecuente que la arterial en la práctica clínica, las enfermed

Although the incidence of venous pathology is much more common than arterial in clinical practice, venous diseases have been given less attention. The pathogenesis of chronic venous disease remains poorly elucidated so far.

At the moment, the most accepted theory behind the pathogenesis of CVD is multifactorial etiology including valvular incompetence and the aging process, noting as a point of origin weakness of the vein wall secondary to smooth muscle cell dysfunction and abnormal metabolism connective tissue, highlighting the valvular incompetence as a consequence of and not as a primary cause of varicose disease. The latest theories are based on the discovery of the biochemical profile of potential varicose veins that is similar to varicose veins, showing alterations in the pre-development of valvular incompetence wall.

This research seeks to clarify whether the alteration in the structure and components of the varicose vein wall precedes the onset of reflux or develops as a result of that, using quantitative and objective methods based on digital image processing.

Different segments of great saphenous veins from patients with CVD undergoing valve reflux (incompetent segments) without valvular reflux (competent segments), selected by doppler ultrasound, were examined, quantified and compared. Also, healthy segments veins without valvular reflux were used as controls. The objectives of this work were to analyze the structural differences between different segments and with the anatomical area where the segments were taken, analyze the different wall components: muscle fibers, extracellular matrix and elastic fibers, and study the association of the parameters under investigation with age and sex of the subjects.

The main contributions of this PhD Thesis can be are summarized as follows:

- Methods that allow objective quantification of different structural components of the vein wall and immunohistochemical markers using techniques of digital image processing techniques are detailed.
- Inferential statistical methods based on resampling techniques are used for the analysis of the numerical data obtained from the vein wall, applicable to small sample sizes. In addition, the availability of pairs of segments of subjects

diagnosed with CVD allowed the performance of statistical test for paired samples without the interference of factors that vary among subjects.

- The structure of the constituent layers of the vein wall is analyzed morphologically and morphometrically based on the anatomical origin of the segments and their hemodynamic characteristics, differentiating between competent and incompetent insufficient segments.
- A correlation analysis has been performed between the measured parameters of the vein wall and the age and sex of the subjects.

# ÍNDICE

Referencia de figuras	v
Referencia de tablas	ix
Acrónimos	xi

1. INTRODUCCIÓN
1.1. ENFERMEDAD VENOSA CRÓNICA4
1.1.1. Algunos hitos en la historia de la enfermedad venosa4
1.1.2. Factores epidemiológicos6
1.1.3. Etiología de la enfermedad venosa crónica7
1.1.4. Clasificación de la enfermedad venosa crónica11
1.1.5. Anatomía y fisiología del sistema venoso de los miembros inferiores12
1.1.6. Histología de la vena safena normal15
1.1.7. Fisiopatología de la enfermedad venosa crónica17
1.1.8. Histopatología de la pared venosa safena insuficiente19
1.1.8.1. Cambios estructurales en la capa íntima19
1.1.8.2. Cambios estructurales en la capa media19
1.1.8.3. Cambios estructurales en la capa adventicia
1.1.8.4. Cambios en los elementos estructurales constituyentes de las
diferentes capas20
1.1.8.4.1. El endotelio en la pared de la vena insuficiente $20$
1.1.8.4.2. La matriz extracelular en la vena insuficiente23
1.1.8.4.3. Las células musculares lisas en la vena insuficiente27
1.1.8.5. El papel de la apoptosis en el desarrollo de la insuficiencia
venosa
1.1.9. El procesado digital de imagenes histologicas en el estudio de la
emermedad venosa cromca
1.2 EL PROCESADO DIGITAL DE IMÁGENES 35
1 2 1 Imágenes digitales 35
1.2.2. Operaciones básicas con imágenes digitales 38
1.2.2.1. Operaciones algebraicas 38
1.2.2.2. Operaciones sobre imágenes en escala de grises
1.2.2.3. Operaciones sobre imágenes binarias

1.2.3.	Segmentación	de imágenes	4	1

1.3.	MÉTODOS ROBUSTOS DE ESTADÍSTICA	
	INFERENCIAL	44

2. JUSTIFICACIÓN	49
3. OBJETIVOS	53
3.1. OBJETIVOS	55
3.2. ΡΙΑΝΤΕΛΜΙΕΝΤΟ DE ΙΑ ΗΙΡΌΤΕSIS DE TRABAIO	55
5.2. I LANTEAMIENTO DE LA III OTESIS DE IRADAJO	00
4. MATERIAL Y MÉTODOS	57
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	59
4.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE LOS SEGMENTOS VENOSOS	59
4 3 ESTUDIOS HISTOOUÍMICOS E	
INMUNOHISTOQUÍMICOS	60
4.3.1. Procesamiento de las muestras	60
4.3.2. Estudios histoquímicos	60
4.3.2.1. Tinción tricrómica de Masson	60
4.3.2.2. Tinción de Van Gieson	61
4.3.2.2.1. Resorcina fucsina	61
4.3.2.2.2. Resorcina fucsina (modificación sin picrofucsina de	9
Van Gieson)	61
4.3.3. Estudios inmunohistoquímicos	61
4.3.3.1. Determinación inmunohistoquímica de CD68	62
4.3.3.2. Determinación inmunohistoquímica de Ki67	62
4.3.3.3. Determinación inmunohistoquímica de VEGF	63
4.3.3.4. Determinación inmunohistoquímica de elastina	64
4.4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DIGITAL	64
4.4.1. Selección de las muestras	64
4.4.2. Estudio microscópico y obtención de imágenes	67
4.4.3. Procesamiento digital de las imágenes	68
4.4.3.1. Cuantificación de fibras musculares y matriz extracelular	69
4.4.3.2. Cuantificación de fibras elásticas	76
4.4.3.3. Cuantificación de marcadores inmunohistoquímicos	80
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84

5. RESULTADOS	5	3
5.1. ANÁLISIS MORFO	OMÉTRICO99	5
5.1.1. Análisis del grosor	de las capas de la pared venosa9	5
5.1.1.1. Muestras con	trol9	5
5.1.1.2. Muestras de s	segmentos competentes procedentes de sujetos	6
5.1.1.3. Muestras de s	segmentos incompetentes procedentes de sujetos	7
5.1.1.4. Comparativa	intergrupo del grosor de las capas según	'
característica	s hemodinámicas del segmento10	0
5.1.2. Análisis de los com	ponentes de fibras musculares y matriz	
extracelular de la p	pared venosa10	6
5.1.2.1. Comparativa	intergrupo de la proporción de fibras	
musculares y	matriz extracelular según las características	
hemodinámic	as del segmento10	7
5.1.2.2. Comparativa	intergrupo de la proporción de fibras	
musculares y	matriz extracelular según procedencia	
anatómica de	el segmento	0
5.1.3. Análisis del compo	nente de fibras elásticas de la pared venosa11	2
5131 Comparativa	intergrupo de la proporción de fibras elásticas	
según caracte	rísticas hemodinámicas del segmento 11	5
5132 Comparativa	intergrupe de la proporción de fibras elécticas	0
5.1.5.2. Comparativa	ancie enertérnice del commente	7
segun proced	encia anatomica del segmento11	(
5.2. ANÁLISIS DE CO	RRELACIÓN11	9
5.2.1 Correlación con la	edad del suieto 11	9
5.2.2 Correlación con el	sevo del sujeto 12	2
5.2.2. Correlation con er		_
5.3. ANÁLISIS MORFO	DLÓGICO124	<b>4</b>
5.3.1. Análisis de las capa	as de la pared venosa insuficiente	4
5.3.2 Análisis de las fibra	as elásticas de la pared venosa insuficiente 13	0
<b>5.5.2.</b> Miansis de las libro	as clasticas de la pared venosa insufficiente	0
6 DISCUSIÓN	19	ર
		J
7. CONCLUSION	<b>E</b> S 15	9
7.1. CUMPLIMIENTO	DE OBJETIVOS 16	1
7.2. CONCLUSIONES	MAS RELEVANTES DEL ESTUDIO 16	2
7.3. RESPUESTA A LO	DS CONTRASTES DE HIPOTESIS	
PLANTEADOS	16	4

8. BIBLIOGRAFÍA	167
-----------------	-----

9.	ANE	Χ	<b>OS</b>	185
$\mathbf{A}$	NEXO	1:	Medidas de grosor de las capas	189
$\mathbf{A}$	NEXO	2:	Medidas de extensión de fibra muscular y matriz	
			extracelular	191
$\mathbf{A}$	NEXO	3:	Medidas de extensión de fibra elástica	193
$\mathbf{A}$	NEXO	<b>4:</b>	Relación de medidas calculadas, sexo y edad de los	S
			sujetos	195

# Referencia de figuras

1. INTRODUCCIÓN1
Figure 1 Sigle IV AC LucimachidAchinac bije de Licémace ruege a
A selenias lo sano do su afossión varicosa ofrendéndolo una pierna do
mármol con varices
Figure 2 Sistema venoso de la extremidad inferior
Figura 3 Estructura de la pared venosa
Figura 4. Histología de la vena safena
<b>Figura 5.</b> Fisiopatología de la enfermedad venosa crónica
<b>Figura 6. a.</b> Muestra de safena interna normal, donde en color negro
(resorcina) se objetiva la presencia de fibras elásticas configurando
una lámina elástica interna pobremente desarrollada entre la íntima
y la media (flecha). También se observan fibras elásticas entre las
células musculares lisas de la capa media y la capa adventicia. $\mathbf{b}$ .
Muestra de safena interna insuficiente, donde se objetiva pérdida de
fibras elásticas en la zona de la lámina elástica interna20
Figura 7. Interacción de leucocitos con el endotelio de la pared venosa22
Figura 8. a. Patrón de elastina en vena sana. b. Patrón irregular de la
elastina como consecuencia de la ruptura de unidades elástico
contráctiles en vena insuficiente (flecha)27
Figura 9. Factores involucrados en el desarrollo de venas insuficientes29
Figura 10. Vías de la apoptosis
Figura 11. Evolución del número de publicaciones indexadas en el PubMed
conteniendo los términos "image analysis" o "image processing", y
simultáneamente el término "histology" o "histophatology"
<b>Figura 12.</b> Pasos para un sistema de diagnostico clínico basado en el analisis
de imagenes de muestras de biopsia
Figura 13. Sistema de coordenadas de la matriz de una imagen
<b>Figura 14.</b> Coordenadas de la matriz de una imagen en color
Figura 15. Confidencial del color mediante el estandar CIELab
Figura 17. Proceso de binarización con diferentes valores de umbral
Figura 18. Histograma de niveles de gris de una imagen 39
<b>Figura 19.</b> Binarización de la imagen de la figura 18 39
<b>Figura 20.</b> Localización de componentes conectados con diferentes tipos de
conectividad
<b>Figura 21.</b> Resultado de la dilatación y erosión de la imagen de la figura 1941
Figura 22. Ejemplo de agrupamiento entre colores en base a las componentes
RGB
Figura 23. Idea general de las técnicas de remuestreo46

4. MA'	ГΕ	RIAL Y MÉTODOS	57
Figura	24.	Muestra de vena safena artefactada teñida con Tricrómico de	
<b>D</b> •		Masson	65
Figura	25.	Tincion de tricromico de Masson con contraste defectuoso	60 C7
Figura	26.	Muestras con tincion de van Gleson	01
Figura	27.	Muestra de vena safena con adventicia artefactada	68
Figura	28.	Variación de color en dos cortes con tinción de tricromico de	70
Figure	20	Massoli	70 71
Figura	29.	Flujograma para la delimitación de fibras muscularos y matriz	11
Figura	50.	$r_{10}$ ovtracelular modiante agrupamiente k means	79
Figure	91	Script de Matlah para la delimitación del contorno interior y	12
rigura	01.	exterior de la pared venosa	73
Figura	32.	Script de <i>Matlab</i> para la delimitación de las componentes de fibra	10
1 iguiu	02.	muscular v MEC	74
Figura	33.	Resultado de las fases de procesamiento de la imagen para la	• •
		cuantificación de fibra muscular y matriz extracelular	75
Figura	34.	Exclusión de defectos de la imagen original	76
Figura	35.	Diferentes tonalidades de tinción de las fibras elásticas con la	•••
8		tinción de resorcina sin picrofucsina	77
Figura	36.	Componentes R. G v B de una imagen con tinción de resorcina sin	•••
0		picrofucsina	78
Figura	37.	Flujograma para la delimitación de fibras elásticas	78
Figura	38.	Script de <i>Matlab</i> para la delimitación de la componente de fibra	
0		elástica	79
Figura	39.	Resultado de las fases de procesamiento de la imagen para la	
		cuantificación de fibras elásticas	80
Figura	40.	Flujograma para la delimitación de los marcadores	
		inmunohistoquímicos	82
Figura	41.	Script de Matlab para la delimitación de marcadores	
		inmunohistoquímicos	83
Figura	42.	Resultado de las fases de procesamiento de la imagen para la	
		cuantificación de marcadores inmunohistoquímicos	84
Figura	43.	Script de $R$ para la obtención de los estadísticos descriptivos de las	
		muestras	86
Figura	44.	Scripts de $R$ para la ejecución de los test de permutación	90
Figura	45.	Script de $R$ para la obtención de los IC mediante bootstrapping	91
Figura	46.	Script de <i>R</i> para el cálculo de la correlación	91
<b>5. RES</b>	UI	TADOS	93
т.			
Figura	47.	Distribución del grosor de las capas en las muestras control, por	00
<b>D</b> !	40	capa y procedencia anatomica	96
r igura	48.	Distribución del grosor de las capas de las inuestras de segmentos	07
Figure	40	Alternationes en al gregor de la intime de la surre sefere interre de	91
r igura	49.	Anteraciones en el grosor de la intilna de la vena salena interna de	00
Figure	50	Distribución del grosor de las capas de las muestras de segmentos	90
rigura	50.	obtenidos de pacientes con insuficiencia venosa, por capa v	
		procedencia anatómica	ga
			53

Figura	51.	Muestras con valores atípicos del grosor en la capa íntima	99
Figura	52.	Comparativa del grosor de las capas íntima y media de las	
		muestras control vs muestras de segmentos competentes	101
Figura	53.	Comparativa del grosor de las capas de las muestras controles vs	
	<b>.</b>	muestras de segmentos incompetentes	102
Figura	54.	Comparativa del grosor de las capas de las muestras de segmentos	
		competentes vs incompetentes	103
Figura	55.	Distribución del grosor de las capas de las muestras pareadas de	105
<b>D</b> •	-	segmentos competentes vs incompetentes	105
Figura	56.	Valores medios de proporcion de fibras musculares y MEC, por tipo	100
<b>D</b> .		de segmento	106
Figura	57.	Distribución de la proporción de fibras musculares y MEC por tipo	107
<b>D</b> :	<b>F</b> 0	de segmento	107
Figura	<b>58.</b>	Distribución de la proporción de fibra muscular y MEC de las	100
<b>F</b> :	50	IC de la proposición modio de fibres proceedences competentes	109
<b>F</b> Igura	<b>39</b> .	de las musstres con inguficiencia unaça	111
Figure	60	de las inuestras con insunciencia venosa	111
<b>r</b> igura	00.	de les muestres con insuficiencie venece	119
Figure	61	Valores medios de la proporción de fibras elásticas por capa y tipo	112
riguia	01.	de segmente	112
Figura	62	Valores medios de la proporción de fibras elásticas por tipo de	110
Iguia	02.	segmento	11/
Figura	63.	Distribución de la proporción de fibras elásticas por tipo de	111
84-4		segmento	114
Figura	64.	Distribución de la proporción de fibras elásticas de las muestras	
0		pareadas de segmentos competentes e incompetentes	116
Figura	65.	IC de la proporción de fibras elásticas según procedencia de las	
0		muestras de segmentos competentes	117
Figura	66.	IC de la proporción media de fibras elásticas según procedencia de	
		las muestras de segmentos incompetentes	118
Figura	67.	Localización de valores atípicos en el grosor de la capa íntima	119
Figura	<b>68</b> .	Recta de regresión muestral del grosor de la capa íntima versus	
		edad, por tipo de segmento	120
Figura	<b>69</b> .	Recta de regresión muestral del grosor de la capa media versus	
		edad, por tipo de segmento	121
Figura	70.	Recta de regresión muestral de la proporción de fibras musculares	
		versus edad, por tipo de segmento	121
Figura	71.	Recta de regresión muestral de la proporción de matriz extracelular	
<b>D</b> •	=0	versus edad, por tipo de segmento	121
Figura	72.	Recta de regresion muestral de la proporción de fibras elasticas	100
<b>D</b> .	70	versus edad, por tipo de segmento	122
Figura	73.	Recta de regresion muestral del grosor de la capa intima versus	100
Figure	71	Sexo, por tipo de segmento	123
<b>F</b> Igura	14.	Recta de regresion muestral del grosor de la capa media versus	109
Figure	75	Sexo, por tipo de segmento	123
rigura	19.	versus sevo, por tipo de segmento	199
Figure	76	Recta de regresión muestral de la proporción de matriz extracolular	120
iguia	10.	versus sexo, por tipo de segmento	194
Figura	77	Recta de regresión muestral de la proporción de fibras elásticas	147
8414		versus sexo, por tipo de segmento	124
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

Figura	78.	<b>a.</b> Pared venosa insuficiente $(4x)$ . <b>b.</b> Desconexión haces fibra
		muscular (20x). c. Colagenización (40x). d. Daños endotelio y
		acumulación de CML (40x)125
Figura	<b>79</b> .	Aspecto de los núcleos marcados con anti-Ki67 en la pared de la
		vena safena (puntas de flecha)125
Figura	80.	a. Inmunotinción con anti-Ki 67 de pared de vena control. b.
		Núcleos marcados en microvasos en capa adventicia de vena
		control
Figura	81.	Inmunotinción con anti-Ki 67 de venas insuficientes competentes $\ldots \ldots 126$
Figura	82.	Inmunotinción con anti-Ki 67 de venas insuficientes incompetentes $\dots 127$
Figura	83.	Inmunotinción con anti-CD68 de la pared de vena control (zonas
		positivas señaladas mediante puntas de flecha)127
Figura	84.	Inmunotinción con anti-CD68 de venas insuficientes competentes $\ldots .128$
Figura	85.	Inmunotinción con anti-CD68 de venas insuficientes incompetentes $128$
Figura	86.	Inmunotinción con anti-VEGF de la pared de vena control (zonas
		positivas señaladas mediante puntas de flecha)129
Figura	87.	Inmunotinción con anti-VEGF de venas insuficientes competentes $\dots 129$
Figura	88.	Inmunotinción con anti-VEGF de venas insuficientes incompetentes . $130$
Figura	89.	Distribución de fibras elásticas en venas insuficientes, con daños en
		la lámina elástica interna (señalados con el símbolo $\Downarrow)\dots\dots131$
Figura	90.	Inmunotinción con antielastina de la pared de vena control131
Figura	91.	Inmunotinción con antielastina de venas insuficientes competentes $132$
Figura	92.	Inmunotinción con antielastina de venas insuficientes
		incompetentes

## Referencia de tablas

1. INTRODUCCIÓN	.1
Tabla 1. Etiología de la enfermedad venosa crónicaTabla 2. Factores de riesgo implicados en el desarrollo de la enfermedad	.7
venosa crónica <b>Tabla 3.</b> Clasificación CEAP, adoptada internacionalmente	.8 12 15
4. MATERIAL Y MÉTODOS5	57
Tabla 5. Desglose de muestras para el estudio del grosor de las capas, según         procedencia y tipo de segmento	65
Tabla 6. Desglose de muestras para el estudio de la componente de fibra         muscular y MEC, según procedencia y tipo de segmento	66
Tabla 7. Desglose de muestras para el estudio de la componente de fibras       elásticas, según procedencia y tipo de segmento	67
5. RESULTADOS 9	<b>}</b> 3
<ul> <li>Tabla 8. Medidas descriptivas del grosor de las capas de las muestras control, desagregadas por procedencia anatómica y valores globales</li></ul>	95
<ul> <li>Tabla 10. Medidas descriptivas del grosor de la capa íntima de las muestras de segmentos incompetentes, desagregadas por procedencia anatómica y valores globales</li></ul>	98
y valores globales	98 01
<ul> <li>Tabla 13. Listado de muestras pareadas de segmentos con insuficiencia venosa para test estadístico del grosor de las capas</li></ul>	$\begin{array}{c} 04 \\ 05 \end{array}$
<ul> <li>Tabla 15. Medidas descriptivas de la proporción de fibras musculares y MEC, desagregadas por tipo de segmento</li></ul>	07
para test estadístico de la proporción de fibras musculares y MEC 10 <b>Tabla 17.</b> Media muestral e IC de la proporción de fibras musculares según procedencia de la muestra	08 10

Tabla 18. Media muestral e IC de la proporción de matriz extracelular según	110
<b>Table 10</b> Valor medio de la proporción de fibras elésticas por tipo de	112
segmento, desagregadas por capas de la pared venosa	113
Tabla 20. Medidas descriptivas de la proporción de fibras elásticas,	-
desagregadas por tipo de segmento	115
Tabla 21. Listado de muestras pareadas de segmentos con insuficiencia venosa	
para test estadístico de la proporción de fibras elásticas	116
Tabla 22. Media muestral e IC de la proporción de fibras elásticas en muestras	
de segmentos competentes, según procedencia de la muestra	117
Tabla 23. Media muestral e IC de la proporción de fibras elásticas en muestras	
de segmentos incompetentes, según procedencia de la muestra	118
<b>Tabla 24.</b> Coeficiente de correlación $\rho$ y valor $p$ para el contraste de hipótesis	
de no asociación entre las variables y la edad del sujeto	120
<b>Tabla 25.</b> Coeficiente de correlación $r_{bp}$ y valor $p$ para el contraste de hipótesis	
de no asociación entre las variables y el sexo del sujeto	122
6. DISCUSION	133
<b>Tabla 26.</b> Relación de estudios analizados	155

## Acrónimos

Acrónimo	Significado						
AG	angiotensina						
Amaf	factor de activación de la apoptosis (apoptosis protease						
Apai	activating factor)						
<b>hFCF</b>	factor de crecimiento de fibroblastos básico (basic fibroblast						
brar	growth factor)						
	arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos						
CADASIL	subcorticales y leucoencefalopatía (cerebral autosomal						
CADASIL	dominant arteriopathy with subcortical infarcts and						
	leukoencephalopathy)						
CC	componente conectado						
CEAP	clínica, etiológica, anatómica y fisiopatológica (clinical,						
(clasificación)	etiology, anatomical and pathophysiology)						
CIELab	codificación L*a*b* de la Comisión Internacional de						
(codificación color)	Iluminación						
CML	células musculares lisas						
DAB	diaminobencidina						
DAO	diagnóstico asistido por ordenador (computer aided diagnostic)						
DPX	dibutilfeniltalato poliestireno xileno						
ΕRβ	receptores estrogénicos beta						
ET-1	endotelina-1						
EVC	enfermedad venosa crónica						
FvW	factor von Willebrand						
GMPc	guanosín monofosfato cíclico						
HSV							
(codificación color)	tonalidad-saturacion-valor						
HSI							
(codificación color)	tonalidad-saturacion-intensidad						
IC	intervalo de confianza						
ICAM	molécula de adhesión intercelular (intercellular adhesion						
ICAM	molecule)						
IL	interleuquina						
IQR	rango intercuartílico						
	proteína de unión al TGF- $\beta$ latente ( <i>latent TGF-<math>\beta</math> binding</i>						
LIBP	protein)						
MEC	matriz extracelular						
MMP	metaloproteinasa de matriz (matrix metalloproteinase)						
NA	noradrenalina						

Acrónimo	Significado					
NED	factor de transcripción nuclear kappa beta (nuclear factor					
NF-KB	kappa beta)					
NO	óxido nítrico					
PAF	factor activador de plaquetas					
PARP	poli adenosina difosfato ribosa polimerasa					
PBS	tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)					
PBST	tampón fosfato salino + Triton					
PBSTGAL	tampón fosfato salino + Triton + gelatina + azida + lisina					
DDCE	factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet derived					
PDGF	growth factor)					
$\mathbf{Q}_1$	primer cuartil					
$\mathbf{Q}_3$	tercer cuartil					
RGB						
(codificación color)	rojo-verde-azui					
SEACV	Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular					
тсе в	factor de crecimiento transformante beta (transforming growth					
1 Gr - p	factor beta)					
ΤΙΜΡ	inhibidor tisular de metaloproteinasas (tissue inhibitors of					
	metalloproteinases)					
TNF	factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor)					
TRIS	trihidroximetilaminometano					
TSP	trombospondina					
TUNEL (técnico)	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End					
TONEL (techica)	Labeling					
μm	micrómetros					
VCAN	moléculas de adhesión vascular (vascular cell adhesion					
	molecule)					
VECE	factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial					
V LIGT	growth factor)					

### 1. INTRODUCCIÓN

Para valorar el alcance cuantitativo de los procesos fisiopatológicos que se producen en la pared vascular se utilizan con frecuencia estudios sobre imágenes histológicas. La cuantificación de objetos de interés en imágenes histológicas es una tarea a la que investigadores de diversos campos de la ciencia se han de enfrentar habitualmente. Las técnicas utilizadas han permitido identificar, delimitar la forma, contar y medir tamaños, y otro tipo de propiedades similares de objetos representados en la imagen, de forma rápida, precisa y reproducible comparada con su realización manual [Pertusa 2010].

Tradicionalmente se han identificado las características morfológicas de las muestras examinadas en el microscopio con varios niveles de magnificación y han sido descritas mediante métodos cualitativos, como escalas ordinales para describir la densidad de los diferentes componentes de la pared [Kockx et al. 1998; García et al. 1999; Janowski et al. 2007], que permite exponer de forma detallada los fenómenos estudiados. Este tipo de estudios es subjetivo, y por lo tanto susceptible de sufrir variaciones bajo las observaciones de un mismo investigador en el tiempo, y entre observaciones de distintos investigadores [Belsare et al. 2012].

Los patólogos utilizan sus "ojos entrenados" para proporcionar información útil para los estudios y la práctica clínica, pero no pueden proporcionar una medida exacta debido a las limitaciones de la percepción visual humana. En un sentido estricto, la idea de que los patólogos pueden cuantificar de manera fiable las características microscópicas a base de impresiones visuales es obsoleta [Laurinavicius et al. 2012].

El abaratamiento de los costes y el incremento de potencia de los computadores propiciaron la aparición de los primeros programas de análisis de imágenes, que con el tiempo han incorporado un número mayor de funcionalidades cubriendo un gran rango de aplicaciones. La disponibilidad de una mayor velocidad de cómputo de los ordenadores y el desarrollo de las técnicas de procesamiento y análisis de la imagen ha permitido recientemente abordar estos estudios mediante evaluaciones cuantitativas más objetivas, sensibles y exactas que los métodos cualitativos visuales. El conjunto de estas técnicas se aplican sobre las imágenes con el objetivo de mejorar su calidad, facilitar su interpretación o proporcionar herramientas para la extracción de información objetiva de ellas [Wollman et al. 2007]. Los métodos de segmentación de la imagen proporcionan una primera aproximación de las estructuras de interés en función de características morfológicas como tamaño, forma, color, etc., posibilitando la discriminación de áreas más pequeñas imperceptibles visualmente, para posteriormente cuantificar los elementos necesarios [Belsare et al. 2012].

El cambio de la tecnología analógica a la digital presenta nuevas oportunidades, aumentando la capacidad y la precisión del análisis, y la recuperación de nueva información invisible para el ojo humano. Este cambio ha resultado en una variedad de aplicaciones de análisis de imágenes orientadas a resolver diversas tareas de diagnóstico del tejido y de investigación. El espectro de estas tareas es amplio: desde la simple morfometría de las células y estructuras de tejido, los estudios moleculares subcelulares, y el análisis de imágenes multiespectrales [Laurinavicius et al. 2012]. En la actualidad existen multitud de aplicaciones software autónomas que permiten el procesamiento digital de imágenes histológicas, como ImageJ (distribución Fiji), R (paquete BiOps), Matlab, Image Pro Plus, etc. [Bajaj et al. 2013; Seletchi 2008; Silva et al. 2004], algunas de las cuales son propietarias y otras de libre distribución, que disponen de la posibilidad de realizar actualizaciones o incorporar módulos específicos que implementen nuevos métodos de análisis de imágenes, extendiendo la capacidad de este tipo de aplicaciones.

La diferencia entre las aplicaciones disponibles en el mercado radica en las funcionalidades que ofrecen y en el modo de interacción con el usuario, pudiendo encontrarse aplicaciones *menu-driven* (interacción con el usuario a través de menús de opciones) o basadas en comandos, incluyendo funcionalidades de edición de imágenes, funcionalidades dependientes de usuarios que de forma desinteresada desarrollan y comparten el código de los diferentes métodos de análisis (lo que no garantiza su disponibilidad), etc.

Teniendo en cuenta lo anterior, el estudio de las alteraciones que se producen en la pared venosa normal o insuficiente es una de las líneas de investigación en las que las técnicas de cuantificación pueden ser empleadas para valorarlas objetivamente y para conocer su evolución.

### 1.1. ENFERMEDAD VENOSA CRÓNICA

Aunque el término insuficiencia venosa crónica se reserva para los individuos que presentan signos o síntomas avanzados de la enfermedad venosa como edema, alteraciones cutáneas y úlceras venosas [Eklof et al. 2009], los desórdenes venosos incluyen un amplio espectro de anomalías morfológicas y funcionales del sistema venoso. La enfermedad venosa crónica (EVC) constituye la afectación venosa más común de los miembros inferiores, representando un subgrupo de individuos que manifiestan quejas o eventos venosos y que requieren estudio y cuidados.

A pesar de que la incidencia de la patología venosa es inmensamente más frecuente que la patología arterial, en la práctica clínica las enfermedades venosas han quedado relegadas a un segundo plano [Martínez 2006].

### 1.1.1. Algunos hitos en la historia de la enfermedad venosa

La patología vascular es conocida desde la antigüedad, existiendo datos directos e indirectos de su existencia en pinturas, esculturas y restos arqueológicos. Los pueblos primitivos más desarrollados, como los egipcios, mesopotámicos e indios, ya dejaron constancia de que padecían este tipo de enfermedades vasculares, tales como las varices y las úlceras venosas.

En el papiro de Ebers (1500 AC) se definen las varices como "hinchazones sinuosas y serpentiformes con numerosos nudos" [Pocard 1997]. Los antiguos griegos llevaban a

sus enfermos ante los sacerdotes para solicitarles que rogaran a sus dioses por la curación de sus varices (figura 1) e Hipócrates de Cos trataba las úlceras varicosas con vendajes y aconsejaba puncionar las varices con la intención de trombosarlas. Herófilo, considerado el primer médico anatomista, estableció diferencias entre la pared arterial y la pared venosa. La escuela romana de cirugía adquirió gran desarrollo, especializándose en operaciones vasculares como la ligadura de vasos, amputaciones, flebotomías y cirugía de varices. En el año 400 DC los árabes trataban las varices por medio de pequeñas incisiones y vendaje compresivo [García-Herrera et al. 2010].



**Figura 1.** Siglo IV AC, *LysimachidAchinae*, hijo de *Lisímaco*, ruega a *Asklepios* lo sane de su afección varicosa ofrendándole una pierna de mármol con varices [Poblete 1994]

A principios del siglo XVII (1603), Jerónimo Fabricio de Aquapendente describe, en su libro "De venarum ostiolis", el aparato valvular de las venas pero no acierta describir su función. Willian Harvey, basándose en los estudios anatómicos de Jerónimo Fabricio, demostró que la sangre de las venas periféricas fluía en dirección centrípeta, y que en esta función las válvulas jugaban un papel importante [Chinchilla 1841].

Durante muchos años la expresión clínica de la insuficiencia venosa crónica fue considerada una enfermedad de la piel, y consecuentemente tratada por médicos dermatólogos [Poblete 1994]. Desde el siglo XIV al XVII se realizan múltiples intentos terapéuticos sobre úlceras varicosas, como medidas compresivas y efectos terapéuticos de sustancias como el vino y ungüentos. A lo largo de los siglos se establecieron diversas teorías para explicar la etiología de las varices y úlceras varicosas. El término úlcera varicosa se debe a Wiseman quien describió el uso de la compresión externa en 1676 [Tavizón et al. 2009].

El tratamiento quirúrgico moderno de la enfermedad varicosa surge a finales del siglo XIX. En el año 1880 Trendelenburg practicaba las ligaduras múltiples e insistía en ligar las venas de la parte media del muslo. El primer stripping se le atribuye a Keller en

1906. Más tarde, en 1907 Babcock incorpora largas sondas provistas de olivas metálicas en sus extremos [Tretbar 1999].

John Homans fue el primero en señalar la relación entre las venas varicosas que aparecían como fenómeno secundario a una tromboflebitis y una úlcera venosa [Homans 1916]. Robert Linton destacó que como consecuencia de una tromboflebitis se producía una alteración importante del sistema valvular de las venas profundas que se traducía en una insuficiencia [Linton 1938]. Schanzer plantea que en la insuficiencia crónica, un 64% de los casos es debido a una incompetencia valvular y el 36% restante es el resultado de síndromes postflebíticos [Schanzer et al. 1982]. Por otro lado, Kistner comunica experiencias del tratamiento quirúrgico de la insuficiencia venosa profunda mediante la reparación directa de las válvulas insuficientes [Kistner et al. 1979].

### 1.1.2. Factores epidemiológicos

La incidencia y prevalencia de la EVC están en constante aumento, repercutiendo de manera notable en la asistencia sanitaria y generando gran número de consultas, tanto en Atención Primaria como en Atención Especializada [Bellmunt et al. 2013].

En los últimos años se han realizado estudios epidemiológicos a nivel nacional (DETECT [Gesto-Castromil et al. 2001], ETIC [Callejas et al. 2004], C-VIVES [Lozano et al. 2001<sup>a</sup>], DETECT-IVC 2006 [Álvarez-Fernández et al. 2008]) e internacional (RELIEF) [Lozano et al. 2001<sup>b</sup>], que revelan la elevada prevalencia y las graves consecuencias de la EVC.

Se ha estimado que la prevalencia de consultas por enfermedad vascular en Atención Primaria en España representa el 3.4% del total de las consultas, constituyendo las flebopatías la primera causa (69%), y dentro de este grupo las varices suponen la mitad de los casos (30.2%). Más de las dos terceras partes de la población (68.3%-71%) que acudieron al médico de Atención Primaria por cualquier causa, referían o padecían algún signo o síntoma de enfermedad venosa crónica, especialmente pesadez de piernas y varículas. En un 2% de los pacientes examinados se encontraron úlceras venosas, existiendo mayor incidencia en el sexo femenino (64% mujeres, 36% hombres) [Álvarez-Fernández et al. 2008].

En el estudio RELIEF (estudio clínico epidemiológico, transversal, prospectivo, multicéntrico e internacional) realizado durante el período comprendido entre febrero de 1997 y mayo de 1998, se analizaron, entre otros, los datos clínicos y físicos, el índice de calidad de vida y la presencia o no de reflujo venoso mediante el análisis con Doppler unidireccional. El estudio determinó la presencia de varices en el 35.7% de los casos (47.7% de la población presentaba reflujo venoso y el 25.2% no presentaba reflujo), concluyendo que la relación síntomas/reflujo no era una relación directa, pudiendo haber ausencia de reflujo en pacientes con insuficiencia venosa crónica [Lozano et al.  $2001^{b}$ ].

### 1.1.3. Etiología de la enfermedad venosa crónica

La etiología más frecuente de la EVC es la primaria, de causa indeterminada o idiopática, que produce reflujo del sistema venoso superficial y afecta de forma mayoritaria a la safena interna. El principal signo que la representa es la presencia de *varices* [Arnoldi 1957].

La etiología secundaria, en general, se debe a episodios de trombosis venosas previas y está causada por la lesión del aparato valvular. Tras la obstrucción del flujo venoso por el trombo que se forma de manera secundaria al proceso inflamatorio, se produce una fibrosis y recanalización secundarias, lo cual puede destruir las válvulas y provocar la insuficiencia. Cuando esta circunstancia tiene lugar en el sistema venoso profundo puede provocar el desarrollo del síndrome postrombótico [Kistner et al. 1996; Nicolaides 2000].

La etiología congénita incluye las alteraciones en el desarrollo embrionario como la aplasia, hipoplasia o persistencia de vestigios embrionarios [Carrasco et al. 2004].

Primaria	Insuficiencia valvular (varices esenciales)
Secundaria	Trombosis venosa profunda Malformaciones arteriovenosas adquiridas Lesiones inducidas por químicos Lesiones inducidas por quemaduras
Congénita	Aplasia Hipoplasia Persistencia vestigios embrionarios Duplicación troncular

Tabla 1. Etiología de la enfermedad venosa crónica [Carrasco et al. 2004]

Aunque la etiología de la EVC no está del todo aclarada, existen múltiples factores de riesgo como el estilo de vida occidental, los cambios hormonales, la obesidad, los traumatismos en piernas, la bipedestación prolongada, las dietas con alimentos muy refinados, la vestimenta ajustada o los factores genéticos, que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (tabla 2) [Carrasco et al. 2004].

Tabla	2.	Factores	de	riesgo	implicados	${\rm en}$	$\mathbf{el}$	desarrollo	de	la	enfermedad	venosa	$\operatorname{crónica}$
		[Carrasco	o et	al. 2004	4]								

•					
CONGÉNITOS	Angiodisplasias (síndrome Klippel-Trenaunay-Weber) Fístulas arterio-venosas Agenesias valvulares Enfermedades del tejido conectivo				
	No modificables	Herencia Edad Sexo Raza Estatura			
PRIMARIOS	Modificables	Obesidad Bipedestación prolongada Exposición al calor Embarazo Hormonas Hábito intestinal Compresión local			
SECUNDARIOS	Trombosis venosa profunda Compresión (tumoral adenopatías, quiste de Baker,) Traumatismos Yatrogenia				

Se consideran tres tipos de factores de riesgo: Congénitos, Primarios y Secundarios, representados en la tabla 2:

1. Congénitos: Alteraciones en el desarrollo embrionario, como la aplasia venosa total, la hipoplasia, la duplicación troncular, o bien la persistencia de vestigios embrionarios. Una de las alteraciones más comunes es el síndrome de *Klippel-Trenaunay* (crecimiento excesivo de huesos y tejidos blandos, hemangiomas planos y venas varicosas).

#### 2. Primarios o idiopáticos

#### a) Factores no modificables:

- <u>Factores genéticos y hereditarios</u>: Existen varios informes que demuestran la agregación familiar en pacientes con venas varicosas. En un estudio realizado en 1969 utilizando un gran árbol genealógico de 249 casos índice, se llegó a la conclusión de que la herencia en la enfermedad varicosa era multifactorial [Hauge et al. 1969]. Otro estudio en 1974 estimó que la transmisión genética oscilaba en torno a un 50% [Matousek et al. 1974]. Por último, Cornu-Thenard et al. (1994) determinaron en un estudio de 134 familias que el riesgo de desarrollar venas varicosas era de un 89% cuando ambos padres padecían insuficiencia venosa crónica, de un 47% si sólo un progenitor la sufría y de un 20% si no existía la afectación de los padres.

Por otra parte, se ha observado que los pacientes con linfedema tienen mayor prevalencia de venas varicosas, en torno a un 25% [Chaudhry et al. 1997]. Un estudio de 18 familias con 74 personas afectas del síndrome distiquiasis-linfedema, que generalmente se presenta en la adolescencia, reveló una prevalencia del 49% de venas varicosas, con una edad de inicio entre los 7 y 28 años e igualdad de afectación en ambos sexos. El análisis genético reveló que 72 de los 74 pacientes con síndrome de distiquiasis-linfedema tenían mutaciones en el gen FOXC2, consistentes principalmente en pequeñas inserciones y deleciones cromosómicas. Este estudio fue el primero que sugirió un posible gen implicado en el desarrollo de venas varicosas [Brice et al. 2002].

Otro biomarcador asociado con el desarrollo de varices es el gen NOTCH3, el cual está mutado en pacientes con arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL) [Saiki et al. 2006].

Otros estudios han encontrado asociaciones entre las venas varicosas y las mutaciones en el promotor de la trombomodulina, que juega un papel importante en el mecanismo de tromborresistencia [Le Flem et al. 2001]. Otras mutaciones detectadas se encuentran en el gen NDP, implicado en la enfermedad de Norrie (ceguera, sordera e insuficiencia venosa) [Rehm et al. 1997] y en el gen del receptor-2 del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) [Law et al. 2006].

Una revisión exhaustiva de bases de datos en modelos animales transgénicos, revelan múltiples genes que producen un fenotipo anormal de la matriz extracelular en la pared arterial. Queda por determinar si estos genes, tales como Adam19 (A Disintegrin And Metalloproteinase 19), fibulina y fibrilina, también juegan un papel en la patogénesis de las venas varicosas [Qi et al. 2009].

- <u>Edad</u>: La prevalencia de venas varicosas se incrementa con la edad [Criqui et al. 2003; Jawien 2003]. El *Estudio Framingham* demuestra una prevalencia del 1% en hombres y del 10% en mujeres menores de 30 años, en comparación con el 57% en hombres y 77% en mujeres mayores de 70 años [Brand et al. 1988]. El *Estudio Venoso de Edimburgo* hace referencia al incremento de la prevalencia de venas varicosas con la edad: 11.5% en edades comprendidas entre 18 y 24 años y del 55.7% en edades comprendidas entre 55 y 64 años [Evans et al. 1999].

El aumento de prevalencia de venas varicosas con la edad puede ser debida a la combinación de varios factores entre los que se incluyen el debilitamiento de los músculos de la pantorrilla, disminución de la movilidad y la reducción de los componentes de la matriz extracelular en las venas con el paso de los años [Lim et al. 2009].

- <u>Sexo</u>: La prevalencia de venas varicosas varía ampliamente, entre 2-56% en hombres y 1-60% en mujeres [Robertson et al. 2008]. La mayoría de estudios coincide en que las venas varicosas son más comunes en mujeres [Brand et al. 1988; Lozano et al. 2001<sup>a</sup>; Criqui et al. 2003; Jawien 2003; Lim et al. 2009], aunque algunos refieren mayor frecuencia en hombres [Evans et al. 1999; Robertson et al. 2008].

- <u>Raza</u>: Parece existir una mayor prevalencia entre los caucásicos que entre los negros o los asiáticos, habiéndose señalado que la menor estatura de los asiáticos [Miyauchi 1913], así como el hallazgo de un mayor número de válvulas en el sistema venoso profundo en negros africanos en comparación con los caucásicos se comportan como factores de protección [Banjo 1987].

- <u>Estatura</u>: Se cree que la mayor estatura predispone al desarrollo de enfermedad venosa crónica por la mayor longitud de la columna hidrostática durante el ortostatismo [Pannier-Fisher et al. 2003].

b) Factores modificables

- <u>Obesidad</u>: Los resultados que relacionan la obesidad con la insuficiencia venosa son contradictorios. La mayoría de los estudios que han encontrado asociación entre obesidad y enfermedad venosa lo han hecho para las mujeres y no para los hombres. Un factor que podría inducir a confusión sería la mayor concentración de estrógenos circulantes en mujeres obesas [Abramson et al. 1981; Ducimetiere et al. 1981; Callam 1994; Evans et al. 1999]. Algunos autores han medido específicamente el perímetro abdominal y lo han hallado como factor de riesgo de enfermedad venosa crónica [Beaglehole et al. 1975; Seidell et al. 1986].

- <u>Bipedestación prolongada</u>: No se ha demostrado la relación causa-efecto entre este factor y la enfermedad venosa crónica, pero se considera factor agravante en presencia de otros factores [Lee et al. 2003].

- <u>Traumatismos directos sobre la pared venosa</u>: Pueden dañar el sistema valvular y provocar su destrucción, desencadenando hipertensión y reflujo en el territorio venoso de los miembros inferiores [Thulesius 1996].

- <u>Gestación</u>: Aunque los factores hormonales y el embarazo influyen en la pared venosa, son temporales y desaparecen tras el parto, no existiendo certeza en la correlación entre embarazo y la presentación de insuficiencia venosa crónica [Mullane 1952; Lee et al. 2003].

- <u>Sedentarismo</u>: Se relaciona con la disminución de la contracción muscular y por ello con el desarrollo de enfermedad venosa crónica [Sisto et al. 1995].

- <u>Estreñimiento</u>: Relacionado con el desarrollo de varices por la relación entre el aumento de presión en la prensa abdominal transmitida al sistema venoso de las extremidades inferiores [Burkitt 1972].

- <u>Otros factores</u>: Otros factores de riesgo como las compresiones locales o selectivas (prendas de vestir ajustadas, medias, vendajes, ...), así como el tabaquismo, la terapia estrogénica, la hipertensión arterial o la diabetes mellitus, se han postulado en el desarrollo o exacerbación de venas varicosas, pero su

implicación es contradictoria en diferentes estudios [Brand et al. 1988; WHO 1998; Lee et al. 2003; Raffeto et al. 2008].

**3. Factores secundarios:** Incluyen trombosis venosa profunda, compresión (tumoral, adenopatías, quiste de Baker, ...) traumatismos y yatrogenia.

#### 1.1.4. Clasificación de la enfermedad venosa crónica

Hasta la década de los 80 no existía ninguna clasificación de la enfermedad venosa aceptada de forma más o menos general y la mayoría de los autores determinaban la existencia de la enfermedad por la aparición de varices, las cuales eran descritas como: "cualquier vena subcutánea dilatada, tortuosa o elongada en las extremidades inferiores" [Arnoldi 1957]. Fue a partir de 1988 cuando, a raíz del estudio de Basilea, comenzó a utilizarse una clasificación basada en el examen físico. Dicho estudio diferenciaba ente varices tronculares, reticulares y telangiectasias [Biland et al. 1988].

En la década de los 90 diversos estudios, como los de Porter o el de Edimburgo, comenzaron a establecer una clasificación de la EVC y de las varices de acuerdo con el tamaño y con la severidad del daño vascular, clasificando las varices en tronculares, reticulares e intradérmicas [Porter et al. 1995; Evans et al. 1999].

La ausencia de precisión diagnóstica, la falta de una clasificación que permitiera la comparación de los resultados de los diferentes estudios y la llegada de las técnicas no invasivas como la ecografía Doppler-dúplex basada en los hallazgos anatómicos y hemodinámicos, indujeron en 1994 al American Venous Forum a poner en marcha un comité *"ad hoc"* que propusiera un consenso de la comunidad médica que definiera y clasificara los desórdenes venosos. El resultado fue la clasificación CEAP (Clinical, Etiology, Anatomy, Pathophysiology), la cual fue adoptada progresivamente facilitando la comunicación al proporcionar un estándar diagnóstico y un método para el intercambio científico [Beebe et al. 1996].

La tabla 3 muestra la clasificación CEAP que valora cuatro elementos: clínica, etiología, anatomía y fisiopatología, más un quinto parámetro que valora el grado de incapacidad.

Tabla	3.	Clasificación	CEAP,	adoptada	internacionalmente.	Fuente:	Sociedad	Española	de
		Angiología y	Cirugía	Vascular					

C-Clínica: evalúa los hallazgos clínicos
CO: no hay signos visibles o palpables de la lesión venosa
C1: presencia de telangiectasias o venas reticulares
<ul> <li>C2: varices, distinguiéndose de las venas reticulares por un diámetro ≥ 3 mm</li> <li>C3: edema</li> </ul>
<ul> <li>C4: cambios cutáneos relacionados con la patología venosa, sin úlceras, dividido en 2 subclases para definir mejor la diferente severidad de la enfermedad venosa:</li> </ul>
<b>C4b</b> , lingdermatagelargeis a strafia blanca, con mayor predisposición para al desarrolla
de úlceras venosas
C5: cambios cutáneos con úlcera cicatrizada
C6: cambios cutáneos con úlcera activa
E-Etiológica: referente a la causa
Ec: congénita
Ep: primaria
Es: secundaria o con causa conocida (postraumática, postrombótica,)
En: sin causa venosa identificada
A-Anatómica: hallazgos anatómicos con Eco-Doppler
As: venas superficiales
Ad: venas profundas
Ap: venas perforantes
An: localización venosa no identificada
P-fisiopatología
Pr: reflujo
Po: obstrucción
Pr,o: ambos
Pn: fisiopatología venosa no identificada
Además, podemos medir la incapacidad causada por la EVC:
0: paciente asintomático
1: paciente con síntomas, no precisa medidas de compresión
2: paciente que puede trabajar 8 horas sólo con medidas de compresión
3: paciente incapaz de trabajar incluso con medidas de compresión

## 1.1.5. Anatomía y fisiología del sistema venoso de los miembros inferiores

El drenaje venoso de los miembros inferiores se realiza a través de dos sistemas: el superficial y el profundo (figura 2). El sistema venoso superficial se sitúa en el espesor del tejido celular subcutáneo, superficialmente a la aponeurosis del sistema muscular. El sistema venoso profundo se sitúa en el espesor de las masas musculares. Ambos sistemas se encuentran unidos a través de venas perforantes, mientras que la unión entre venas del mismo plano se realiza a través de venas comunicantes sin atravesar el plano aponeurótico [Gray 1918; Caggiati et al. 2002; Moore 2007; Uhl et al. 2013].



Figura 2. Sistema venoso de la extremidad inferior [Moore 2007]

El sistema venoso superficial incluye dos sistemas principales, el de la vena safena interna o mayor y el de la vena safena externa o menor. Ambas venas nacen en las redes venosas del pie y desembocan en el sistema venoso profundo a nivel de la ingle en la vena Femoral y del hueco poplíteo en la vena Poplítea, respectivamente. Las venas presentan válvulas bicúspides que evitan el reflujo sanguíneo. El número y distribución de éstas es variable (8 a 13 válvulas en cada una de ellas [Kosinski 1926; Ortega et al. 1997]), observándose una variación de entre 0 y 20 válvulas en la vena safena interna [Psaila et al. 1989], existiendo siempre una válvula a nivel de la desembocadura de la vena superficial en el sistema venoso profundo, llamada válvula ostial.

Las venas del sistema profundo transcurren adyacentes a arterias y nervios. Estas venas reciben el flujo venoso a través de las venas perforantes, y las uniones safeno-femoral y safeno-poplítea [Gray 1918]. El sistema de venas perforantes reviste importancia fisiopatológica en la génesis de los trastornos tróficos de la insuficiencia venosa. Las válvulas permiten que la dirección del flujo sea unidireccional de forma que la sangre drene desde el sistema venoso superficial al sistema profundo.

La vena safena interna es la vena más larga del organismo y se origina por delante del maléolo interno, como continuación de la vena marginal interna del pie. Asciende por la pierna siguiendo el borde medial de la tibia, inmersa en el tejido celular subcutáneo, pasa detrás del cóndilo femoral interno y continúa por el muslo hasta llegar a la ingle donde perfora la aponeurosis para desembocar en la vena femoral común a 4 cm por debajo del arco inguinal. A este nivel se encuentra una válvula ostial que evita el reflujo del sistema venoso profundo al superficial. Cerca de su desembocadura a nivel del cayado, recibe a las venas circunfleja ilíaca superficial, epigástrica superficial y pudendas externas así como una vena comunicante procedente de la vena safena externa, la vena de Giacomini o Vena Accesoria Posterior [Caggiati et al. 2002; Moore 2007].

Desde el punto de vista fisiológico el sistema venoso se considera un "sistema da capacitancia" por la gran distensión que logran alcanzar las paredes de sus venas. Estas son de 6 a 10 veces más elásticas que las arterias y oponen escasa resistencia al flujo sanguíneo que circula a través de ellas a baja presión, lo que le permite almacenar una enorme cantidad de sangre, correspondiente a un 70% de la volemia. La menor cantidad de fibras musculares en la estructura anatómica de la pared venosa favorece este hecho [Poblete 1994; Calderón 2007]. El retorno venoso se efectúa en un 90% por el sistema venoso profundo y solo el 10% regresa por el sistema venoso superficial [Rutherford 1995], existiendo factores que lo modifican, dificultándolo o favoreciéndolo (tabla 4) [Ramos et al. 2000].

De forma muy genérica puede decirse que la presión en las venas de los miembros inferiores viene determinada por dos componentes: la presión hidrostática generada por la columna de sangre desde la aurícula derecha al pie, y un componente hidrodinámico relacionado con las presiones generadas por las contracciones de la musculatura esquelética de la pierna y la presión en la red capilar. Ambos componentes están influenciados por la acción de las válvulas venosas.

Durante la bipedestación, sin la actividad de la musculatura esquelética, la presión venosa en los miembros inferiores depende del componente hidrostático y del flujo capilar, pudiendo llegar a 80-90 mm Hg. Durante la deambulación, la contracción de la musculatura esquelética aumenta la presión en el sistema venoso profundo de forma transitoria. Las válvulas venosas competentes, tanto de las venas profundas como de las perforantes, aseguran el flujo venoso hacia el corazón, favoreciendo el vaciado y reduciendo la presión a 30 mm Hg. Cuando se presenta incompetencia en las válvulas de venas perforantes, las altas presiones generadas en el sistema venoso profundo durante la contracción muscular son transmitidas al sistema venoso superficial y a la microcirculación de la piel. Las altas presiones mantenidas en el tiempo son las responsables de la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad venosa crónica [Bergan et al. 2006].


La ecografía Doppler ha permitido el estudio de los patrones de flujo venoso y el comportamiento de las válvulas. Normalmente el flujo venoso es pulsátil y las válvulas venosas se abren y cierran aproximadamente 20 veces por minuto durante la bipedestación. Cuando los senos de las válvulas permanecen abiertos, éstos no contactan con la pared, produciéndose un flujo proximal y también un flujo vortical (flujo turbulento en rotación espiral) entre los senos valvulares y la pared venosa, evitando la estasis sanguínea. El cierre de la válvula se produce cuando la presión generada en los senos de la válvula excede a la presión generada en el lado luminal valvular, originada por el flujo proximal [Qui et al. 1995; Lurie et al. 2003; Bergan et al. 2006].

#### 1.1.6. Histología de la vena safena normal

Estructuralmente, las venas son vasos sanguíneos de paredes más delgadas y flexibles, con un menor contenido en fibras musculares y elásticas y mayor cantidad de tejido conjuntivo que las arterias. Según progresan hacia el corazón aumentan el diámetro y el calibre de su pared. En general, se distinguen tres capas en su pared: **íntima, media** y **adventicia** (figura 3) y, a diferencia de las arterias, los límites entre capas son difusos. Las *láminas elásticas* pueden estar presentes entre la capa íntima y media (interna) o bien entre la capa media y la adventicia (externa) [Welsh 2006].

Aplicación del análisis digital de imágenes al estudio de la pared de venas procedentes de pacientes con insuficiencia venosa



Figura 3. Estructura de la pared venosa. Fuente: Wikipedia

La vena safena interna es una vena de mediano calibre, donde la túnica íntima está formada por un endotelio con su lámina basal y por fibras elásticas, sin formar una lámina elástica interna como tal. La túnica media posee una capa de células musculares lisas, más delgada y de organización más laxa que la de las arterias de similar diámetro. La capa adventicia suele ser la capa de mayor grosor. Como otras venas de miembros superiores e inferiores, presenta válvulas que poseen dos lengüetas semicirculares, constituidas por finos repliegues de la capa íntima reforzados internamente por una capa de fibras colágenas y una red de fibras elásticas que se continúan con la de la capa íntima de la pared del vaso (figura 4). Cuando la sangre fluye en dirección centrípeta hacia el corazón, las cúspides de las válvulas se aplanan contra la pared del vaso, pero si se produce un aumento de la presión proximal, los bordes de los repliegues se aproximan entre sí, evitando el reflujo [Milroy et al. 1989; Naoum et al. 2007].



Figura 4. Histología de la vena safena. Fuente: propia

La **capa íntima** de la vena safena delimita la luz vascular y está constituida por una capa de células endoteliales (epitelio plano simple) recubierta externamente por una

lámina basal, una capa subendotelial delgada con células musculares lisas dispersas entre los elementos del tejido conjuntivo y una membrana elástica interna fina [Ross et al. 2007].

La **capa media** contiene varios estratos de células musculares lisas de disposición circular entremezcladas con fibras colágenas y elásticas. Además, en el límite con la adventicia puede haber células musculares lisas de disposición longitudinal [Ross et al. 2007]. El tejido fibroso predomina en las venas próximas al corazón y el tejido muscular en las venas de los miembros inferiores [Milroy et al. 1989; Somers et al. 2006].

La **capa adventicia** corresponde a la capa externa, típicamente más gruesa que la capa media y compuesta por fibras colágenas y redes de fibras elásticas [Ross et al. 2007]. En esta capa también se encuentran los *vasa vasorum* que son fuente de nutrición y oxígeno de la pared venosa [Ritman et al. 2007].

#### 1.1.7. Fisiopatología de la enfermedad venosa crónica

La diversidad de signos y síntomas asociados con la enfermedad venosa crónica parece estar relacionada en su conjunto con la hipertensión venosa. En la mayoría de los casos, esta hipertensión está causada por el reflujo a través de válvulas incompetentes de los sistemas venosos superficial, profundo y perforante en su conjunto o de algunos de ellos de forma aislada [Bergan et al. 2006]. En otras ocasiones, la hipertensión se debe a una obstrucción al flujo venoso debida a una trombosis venosa o a una anomalía congénita, al fallo de la bomba muscular de la pantorrilla debido a la inmovilidad de la pierna o la obesidad y en un número menor de casos a un traumatismo (figura 5) [Kistner et al. 1996; Labropoulos 2003; Carrasco et al. 2004].



Figura 5. Fisiopatología de la enfermedad venosa crónica [Carrasco et al. 2004]

## Aplicación del análisis digital de imágenes al estudio de la pared de venas procedentes de pacientes con insuficiencia venosa

Se han propuesto múltiples teorías para explicar el desarrollo de la enfermedad venosa crónica, entre ellas, la teoría valvular, la teoría parietal y la teoría fistular. La **teoría** valvular sostiene que el daño del aparato valvular, por factores congénitos y hereditarios [Golledge et al. 2003], lleva a la incompetencia, reflujo y dilatación venosa; la **teoría parietal** ubica la alteración primaria en la pared con infiltración de tejido fibroso y posterior dilatación, tortuosidad e insuficiencia valvular secundaria [Rose et al. 1986], y la **teoría fistular** relaciona las varices con la presencia de fístulas arteriovenosas entre diversas arterias subaponeuróticas y vasos tributarios de venas superficiales, derivando en un aumento de la presión venosa, dilatación y posterior incompetencia valvular en venas tributarias en primer lugar, alcanzando, más tarde, troncos venosos mayores [Haimovici 1987]. Por lo tanto, la fisiopatología de la enfermedad venosa crónica permanece poco aclarada hasta el momento.

Trabajos recientes consideran la existencia de una lesión parietal como el inicio del proceso. Los cambios en los diferentes estratos de la pared venosa y la alteración de sus componentes podría traer como consecuencia el aumento de la presión y el volumen de estasis sanguínea [Somers et al. 2006; Oklu et al. 2012].

Los cambios en la pared vascular se han constatado tanto en venas dispuestas en posición arterial como en arterias sometidas a hipertensión, que muestran remodelado compensatorio de sus paredes secundario al aumento de presión [Liu et al. 1998; Zhang et al. 1999].

Sin embargo, la bibliografía es contradictoria cuando se analizan los cambios cuantitativos que sufre la pared venosa afectada: aumento [Rose et al. 1986; Maurel et al. 1990; Gandhi et al. 1993; Porto et al. 1995; Travers et al. 1996; Wali et al. 2002<sup>b</sup>; Elsharawy et al. 2007], disminución [Svejcar et al. 1963; Niebes et al. 1977; Psaila et al. 1989] o no alteración [Venturi et al. 1996; Kockx et al. 1998] en el contenido relativo de colágeno en la matriz extracelular. Disminución [Gandhi et al. 1993; Chello et al. 1994; Travers et al. 1996; Venturi et al. 1996; Wali et al. 2002<sup>b</sup>] o no alteración [Svejcar et al. 1996; Wali et al. 2002<sup>b</sup>] o no alteración [Svejcar et al. 1996; Wali et al. 2002<sup>b</sup>] o no alteración [Svejcar et al. 1996; García et al. 1999] en el contenido relativo de fibras elásticas o elastina en la matriz extracelular. Y aumento [Khan et al. 2000; Svejcar et al. 1963], disminución [Travers et al. 1996; Wali et al. 2001; Wali et al. 2003] o no alteración [Kockx et al. 1998; Elsharawy et al. 2007] en el contenido relativo de células musculares lisas en la pared de la vena.

En la actualidad la etiología multifactorial es la más aceptada en la patogénesis de la EVC. La incompetencia valvular y el proceso del envejecimiento señalan como punto de origen la debilidad de la pared vascular a la disfunción del músculo liso y al metabolismo inapropiado del tejido conjuntivo, y resaltan la incompetencia valvular como secuela y no como causa primaria de la enfermedad venosa [Somers et al. 2006; López-Loyo 2011]. Estas últimas teorías se sustentan en el descubrimiento del perfil bioquímico de las venas insuficientes potenciales (competentes), el cual es similar al perfil de las venas insuficientes ya establecidas (incompetentes), existiendo alteraciones en la pared previas al desarrollo de la incompetencia valvular [Svejcar et al. 1963; Gandhi et al. 1993].

## 1.1.8. Histopatología de la pared venosa safena insuficiente

A nivel macroscópico las venas afectadas por insuficiencia venosa se encuentran irregularmente elongadas y dilatadas, presentando un engrosamiento parietal variable, zonas nodulares ectásicas y zonas tortuosas elongadas [López-Loyo 2011].

## 1.1.8.1. Cambios estructurales en la capa íntima

Respecto a los cambios que pueden apreciarse en la capa íntima de las venas safenas internas insuficientes, la mayoría de los autores refieren una hipertrofia de aquella [Khan et al. 2000; Elsharawy et al. 2007], mientras que otros no encuentran modificaciones significativas [Mashiah et al. 1991].

Cuando se produce, la hipertrofia intimal de las venas insuficientes es descrita como irregular habiéndose objetivado zonas con protrusión o áreas tipo "cojín", "áreas con plegamiento" y "áreas con oclusión de la luz", las cuales dan una apariencia irregular a la capa íntima. Este engrosamiento se atribuye fundamentalmente al aumento del colágeno que se encuentra entremezclado con fibras elásticas desorganizadas y desorientadas entre células musculares lisas. Junto a las áreas de protrusión se describen zonas más delgadas con daño intimal severo observándose la alternancia de zonas de atrofia con haces de colágeno inmaduro fragmentados con zonas de fibrosis endotelial [Khan et al. 2000; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007].

La lámina elástica interna está interrumpida en la mayoría de los casos apreciándose una disminución franca de las fibras elásticas. Al mismo tiempo las células endoteliales pueden descamarse lo que produce zonas denudadas de endotelio [Khan et al. 2000; Wali et al. 2002<sup>a</sup>; Elsharawy et al. 2007].

El engrosamiento de la capa íntima en las venas insuficientes se ha relacionado con el incremento en la liberación de mediadores endoteliales ante mecanismos de hipoxia y estrés. Estos mediadores son capaces de producir la remodelación de componentes musculares de la pared [Michiels et al. 2002; Lim et al. 2009].

Es importante señalar que la vena sin insuficiencia puede, con el paso de los años, tener aumentada la capa de células musculares lisas de orientación longitudinal subendotelial. Estos cambios se atribuyen a la fleboesclerosis y no a los cambios observados en la enfermedad venosa crónica [Somers et al. 2006; López-Loyo 2011].

### 1.1.8.2. Cambios estructurales en la capa media

En la capa media de las venas insuficientes se describe una fibrosis progresiva rica en colágeno que da lugar a una atrofia parietal con desaparición de estructuras musculoelásticas y desorganización general de la pared [Sarmiento Ramos 1994]. Esta colagenización separa haces de fibras musculares lisas, las cuales se encuentran desorganizadas y en su mayoría atróficas, existiendo depósito de proteoglicanos alrededor de grupos celulares musculares [López-Loyo 2011].

## Aplicación del análisis digital de imágenes al estudio de la pared de venas procedentes de pacientes con insuficiencia venosa

Diversos estudios sugieren una hipertrofia de las capas musculares en las venas varicosas [Kockx et al. 1998; Wali et al. 2001], con la pérdida del aspecto fusiforme de las células musculares lisas resultando en formas más irregulares con la aparición de proyecciones de su membrana celular [Elsharawy et al. 2007].

Por otra parte, la fibrosis focal con parcial destrucción de las fibras elásticas se considera una condición postinflamatoria (fleboesclerosis secundaria). En muchos casos, en la pared de la vena insuficiente se encuentra un aumento de fibras elásticas fragmentadas y dispersas en la capa media (figura 6) entre los haces de fibras musculares lisas [Wali et al. 2001; Elsharawy et al. 2007], no observándose conexión entre las fibras elásticas y las células musculares lisas [Kockx et al. 1998].



Figura 6. a. Muestra de safena interna normal, donde en color negro (resorcina) se objetiva la presencia de fibras elásticas configurando una lámina elástica interna pobremente desarrollada entre la íntima y la media (flecha). También se observan fibras elásticas entre las células musculares lisas de la capa media y la capa adventicia. b. Muestra de safena interna insuficiente, donde se objetiva pérdida de fibras elásticas en la zona de la lámina elástica interna. Fuente: propia.

### 1.1.8.3. Cambios estructurales en la capa adventicia

En las venas insuficientes los cambios en la capa adventicia muestran un incremento de tejido colágeno denso e hiperplasia de la pared de sus vasos [Lopez-Loyo 2011], así como una acumulación de fibras elásticas [Kockx at al. 1998; Wali et al. 2002<sup>b</sup>], y ocasionalmente algunos vasa vasorum que habitualmente muestran su luz colapsada [Sarmiento Ramos 1994].

### 1.1.8.4. Cambios en los elementos estructurales constituyentes de las diferentes capas

#### 1.1.8.4.1. El endotelio en la pared de la vena insuficiente

El endotelio participa de forma activa y reactiva en las respuestas inmunológicas e inflamatorias de la pared de la vena, detectando cambios en su entorno, y respondiendo mediante la síntesis y liberación de multitud de mediadores y factores de crecimiento.

Las células endoteliales tratan de mantener un delicado balance entre los factores de crecimiento y sus inhibidores, los agentes vasodilatadores y vasoconstrictores, la expresión de citoquinas y las proteínas procoagulantes y anticoagulantes [Davies et al. 1993]. Las alteraciones en el metabolismo endotelial pueden inducir la proliferación y migración de las células musculares lisas (CML), y la degradación de la matriz extracelular (MEC), que dan lugar a una reestructuración de la pared vascular [Naoum et al. 2007].

Ultraestructuralmente las venas insuficientes muestran una degeneración y apariencia descamada de las células endoteliales. La pérdida de esta barrera facilita la migración de componentes sanguíneos a las capas subyacentes, así como la pérdida de componentes de la pared como fibras de colágeno y fibras elásticas en la luz de la vena [Wali et al. 2002<sup>a</sup>].

Algunos estudios observan una mayor adhesión de neutrófilos al endotelio venoso tras la perfusión vascular con una solución hipóxica. Este hecho sugiere una activación del endotelio ante la disminución de la presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>) por debajo de ciertos niveles, como sucede en la estasis sanguínea [Michiels et al. 1997]. De hecho, la insuficiencia venosa se asocia con alteraciones de la perfusión y la estasis sanguínea, provocando una disminución de la tensión de oxígeno que altera el endotelio como consecuencia de la hipoxia [Somers et al. 2006]. Otros factores también involucrados en la activación de las células endoteliales están relacionados con su extensión mecánica, causada por las alteraciones del flujo sanguíneo y de la tensión de cizallamiento, siendo esta última el principal factor que afecta a la función de las células endoteliales [Ojdana et al. 2009].

En la situación descrita se produce una intensa infiltración leucocitaria a nivel vascular. El proceso de extravasación de leucocitos implica la activación de las integrinas de los leucocitos, y su unión con las moléculas de adhesión de la superficie endotelial para la constitución de una adhesión fuerte que frene el desplazamiento del leucocito [Michiels et al. 2002]. Este proceso puede dividirse en 4 etapas: desplazamiento, activación, adhesión y migración transendotelial (figura 7) [Boisseau 2007; Ojdana et al. 2009].

Los leucocitos circulantes en plasma y las células endoteliales expresan L-selectina y Eselectina respectivamente, que establecen uniones transitorias en la etapa de desplazamiento. En las venas insuficientes se observa una mayor producción de citoquinas (Interleucina-8) y del factor activador de plaquetas (PAF), que regulan la rápida expresión de las moléculas de adhesión al objeto de atraer y activar a los leucocitos promoviendo su adherencia al endotelio. La activación de los leucocitos resulta en el desprendimiento de las selectinas leucocitarias tras la acción de enzimas proteolíticas circulantes en plasma como moléculas solubles tras su desprendimiento, y la activación de las integrinas [Boisseau 2007; Ojdana et al. 2009].

La activación de las integrinas en los leucocitos permite el establecimiento de uniones firmes entre éstas y las moléculas de adhesión expresadas en la superficie endotelial. Los niveles plasmáticos de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) se han observado elevados en pacientes con desórdenes venosos crónicos respecto a controles [Saharay et al. 1998, Coleridge 1999].

La adhesión de los neutrófilos al endotelio hipóxico libera radicales libres derivados del oxígeno y proteasas con la capacidad de degradar diversos componentes de la matriz extracelular, así como mediadores inflamatorios, tales como citoquinas y leucotrienos- $B_4$ , desencadenando una mayor respuesta inflamatoria [Michiels et al. 1997; Lim et al. 2009].



Figura 7. Interacción de leucocitos con el endotelio de la pared venosa [Ojdana et al. 2009]

El aumento de adhesiones fuertes de neutrófilos al endotelio venoso, conlleva una intensa infiltración leucocitaria en la pared de las venas insuficientes, principalmente por macrófagos y linfocitos, lo que en condiciones de estasis venosa e hipoxia puede conducir al desarrollo de úlceras venosas crónicas [Somers et al. 2006].

La infiltración leucocitaria también se observa en sujetos control, aunque es mucho más acentuado en pacientes con enfermedad venosa debido a los daños existentes en el endotelio, por cuyo motivo se expresan mayores cantidades de moléculas de adhesión [Coleridge 1999; Bergan 2007].

En las venas insuficientes también se muestra mayor expresión del factor von Willebrand (FvW) liberado por las células endoteliales, facilitando la adhesión plaquetaria al endotelio dañado [Saharay et al. 1998].

La hipoxia endotelial también podría ser responsable de liberar mediadores implicados en la migración y proliferación de las células musculares lisas de la capa subyacente, siendo uno de los causantes del engrosamiento de la íntima. El endotelio de las venas insuficientes libera factores de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), en respuesta a cambios metabólicos y alteración de las bombas iónicas durante la hipoxia [Michiels et al. 2002; Lim et al. 2009].

Introducción

La capa endotelial también se considera implicada en el tono de la pared del vaso mediante la liberación de diversas sustancias. La pared enferma de la vena insuficiente se estrecha mediante un complejo mecanismo de factores vasoconstrictores y vasodilatadores regulados por el endotelio [Lim et al. 2009]. Las células endoteliales de las venas insuficientes secretan menor número de sustancias vasoconstrictoras como la noradrenalina (NA), la angiotensina II (AGII), la endotelina-1 (ET-1) y la densidad de receptores de endotelina-B, a diferencia de las venas normales [Agu et al. 2002]. Al mismo tiempo, como factor vasodilatador, los niveles de óxido nítrico/GMP cíclico (NO/GMPc) se encuentran aumentados en situaciones de incompetencia venosa colaborando, junto a los bajos niveles de NA en invertir el equilibrio de factores vasoactivos hacia la vasodilatación. Los estudios muestran un nivel alto de NO/GMPc junto con niveles más bajos de AGII en venas insuficientes con respectos a venas control, lo que da como resultado la relajación endotelial y la pérdida de tono de la pared venosa insuficiente [Schuller-Petrovic et al. 1997].

#### 1.1.8.4.2. La matriz extracelular en la vena insuficiente

La matriz extracelular de la pared venosa está compuesta fundamentalmente por colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas. Estos componentes forman una malla en la que se localizan las CML, las cuales desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad vascular y la homeostasis celular. Un desequilibrio entre las CML y la MEC da lugar a una pérdida de las propiedades mecánicas de la pared venosa, hecho que sucede en las venas insuficientes [Somers et al. 2006]. Por otro lado, la deformación de la pared de la vena insuficiente no se distribuye uniformemente a lo largo de la pared, pudiendo observarse áreas hipertróficas o áreas hiperplásicas con presencia de nuevo material celular o matriz extracelular en contraste con otras áreas atróficas o no afectadas, lo que podría explicar la tortuosidad en la morfología de las venas insuficientes [Badier-Commander et al. 2000].

Los cambios de la MEC afectan principalmente a sus dos grandes componentes, la elastina y el colágeno, exponiéndose a continuación los cambios que se producen durante el desarrollo del proceso de insuficiencia venosa.

#### Colágeno y elastina en el espacio extracelular

El colágeno y la elastina son proteínas de la matriz extracelular determinantes de las propiedades mecánicas de la pared del vaso. La textura y la resistencia a la tracción de la pared venosa se caracterizan por su contenido de colágeno. Aunque las fibrillas de colágeno oponen poca resistencia a cualquier fuerza de flexión o torsión, su capacidad para agruparse formando paquetes de haces paralelos que conforman las fibras de colágeno les confiere una capacidad elevada para resistir tensiones de tracción [Parry 1988]. A diferencia del colágeno, las fibras elásticas confieren elasticidad a la pared permitiendo cambios constantes del calibre de la pared para adecuarse a las necesidades del flujo sanguíneo, asegurando el retorno a su forma original tras cesar la fuerza deformadora. Las fibras elásticas se componen en su mayor parte de un núcleo de elastina sobre el que discurren de forma paralela un conjunto de microfibrillas o

microfilamentos de fibrilina. La elastina en estado relajado adopta una forma aleatoria plegada sobre si misma, que se puede estirar, pero que vuelve a la disposición enrollada sobre si misma cuando se relaja [Arribas et al. 2006].

Generalmente el contenido de colágeno corresponde al 35.9% del peso seco de la pared venosa, y el contenido de elastina es el 15.8%. En la vena insuficiente el contenido de colágeno aumenta hasta el 43.5%, y el contenido de elastina disminuye al 11.1%, observándose una disminución del ratio elastina/colágeno con la enfermedad venosa [Chello et al. 1994]. La cantidad de colágeno aumenta con la senectud, fenómeno conocido como fleboesclerosis, el cual no participa directamente en el desarrollo de las venas insuficientes [Milroy et al. 1989].

Las fibrillas de colágeno están formadas por tres cadenas peptídicas arrolladas en hélice denominadas cadenas alfa. Los diversos tipos de cadenas alfa que componen las fibrillas da origen a diversas clases de colágeno. De todos los tipos de colágeno descritos en la literatura, sólo de algunos de ellos ha sido documentada su presencia en la pared de la vena, siendo los de mayor importancia el colágeno tipo I y tipo III [Jacob 2003; Haviarova et al. 2008]. Las fibras de colágeno tipo I son más gruesas que las de colágeno tipo III, habiéndose observado la coexistencia de moléculas de tipo I y tipo III en la estructura de fibras de colágeno individuales [Fleischmajer et al. 1990]. El colágeno tipo I es el más abundante en la pared venosa, lo que le proporciona resistencia a la tracción (rigidez), mientras que el tipo III está implicado en su elasticidad. Los cambios en la concentración de la elastina y el colágeno o un cambio en la proporción relativa de los tipos de colágeno indicados pueden por lo tanto tener un efecto notable sobre las propiedades mecánicas de la pared de la vena [Chello et al. 1994].

La gran mayoría de trabajos que estudian la variación de ambos tipos de colágeno en venas insuficientes con respecto a controles observan que el colágeno tipo I siempre se encuentra en mayor cantidad que el tipo III [Chello et al. 1994; Sansilvestri-Morel et al. 2001]. Los resultados en cuanto a la variación de ambos tipos de colágeno son contradictorios, observándose ligeros aumentos de colágeno tipo III en las venas enfermas [Chello et al. 1994], ligera disminución de colágeno tipo III [Waksman et al. 1997], disminución significativa del colágeno tipo III y aumento significativo del colágeno tipo I [Sansilvestri-Morel et al. 2001], y aumento significativo del tipo III [Haviarova et al. 2008]. Esta alteración puede considerarse como un desencadenante del desarrollo de la insuficiencia venosa [Somers et al. 2006].

La elastina es una proteína sintetizada y secretada por las CML vasculares que se une al colágeno y forma una red que proporciona resistencia a la distensión de la pared vascular. Además de las anteriormente mencionadas láminas elásticas, existe una tupida red de fibras elásticas que se conectan a las fibras musculares mediante las denominadas unidades elástico contráctiles, que proporciona un mecanismo para la transmisión de tensión a lo largo de la pared del vaso. Por lo tanto, las células del músculo liso y la elastina parecen formar una unidad funcional continua que proporciona elasticidad y resistencia a la pared ante los incrementos de volumen vascular [Davis 1992; Somers et al. 2006].

En las venas insuficientes, el porcentaje de elastina se encuentra significativamente disminuido [Gandhi et al. 1993; Chello et al. 1994; Venturi et al. 1996; Peña et al. 2004] y, además, muestra un patrón desorganizado con pérdida de conexión con las CML [Kockx et al. 1998; Wali et al. 2003]. Se observa una disminución del ratio elastina/colágeno en las venas insuficientes, con la degeneración de la red estructural de estos componentes, y la consiguiente alteración de las propiedades de rigidez y elasticidad de la pared [Venturi et al. 1996; Elsharawy et al. 2007].

#### Degradación de la matriz extracelular

La degradación de la MEC está regulada por las proteinasas, principalmente por las metaloproteinasas de matriz (MMP) y las serina proteinasas. La actividad proteolítica de cada proteinasa está regulada por la activación de la enzima inactiva, y por la acción de su inhibidor. Los inhibidores de las MMP son los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz (TIMP). Los inhibidores de las serina proteinasas implicadas en la remodelación vascular son la  $\alpha$ 1-antitripsina, la  $\alpha$ 2-macroglobulina y la elafina [Jacob 2003].

Las MMP ejercen un papel fundamental en el remodelado de la pared de las venas insuficientes. Su actividad puede regularse mediante su activación y su interacción con alguno de sus inhibidores fisiológicos, como la  $\alpha$ 2-macroglobulina o sus inhibidores TIMP. Hasta la fecha se han descubierto 14 tipos de MMP en los vasos sanguíneos, y se han reconocido 4 tipos de TIMP, con propiedades funcionales diferentes, aunque cada uno de los TIMP pueden inhibir múltiples MMP [Kucukguven et al. 2013].

Las MMP son clasificadas según su estructura primaria y la especificidad de su sustrato en colagenasas, gelatinasas, estromelisinas, matrilisinas, asociadas a membrana y un grupo de otras. El colágeno, la elastina, la gelatina y los proteoglicanos, componentes importantes de la MEC, son sustratos de las MMP. En el grupo de las colagenasas se incluye las MMP-1, MMP-8 y MMP-13, que degradan varios tipos de colágeno, mayoritariamente fibras de tipo I, II y III. En las gelatinasas se incluye la MMP-2 y la MMP-9, que digieren colágenos desnaturalizados (gelatinas), así como otros componentes de la MEC como elastina, laminina, etc. En las estromelisinas se encuentra la MMP-3 y la MMP-10, similares a las colagenasas en cuanto a la especificidad del sustrato. Degradan una amplia variedad de moléculas de la matriz y participan en la activación de varios proMMP (MMP-1, MMP-8 y MMP-9, entre otros). Las matrilisinas incluyen la MMP-7 y la MMP-26, que procesan moléculas de la superficie celular externas a la MEC como el ligando-Fas, la integrina B4, etc. En los asociados a membrana se encuentra el MMP-14 que digiere colágeno de tipo I, II y III, así como diversas proteínas de la MEC, y activa las formas latentes de la MMP-2 y la MMP-13. En el grupo de otras destaca la MMP-12 involucrada en la degradación de la elastina [Kucukguven et al. 2013].

Aunque sólo pequeñas cantidades de colágeno y fibras elásticas se degradan normalmente, en las enfermedades vasculares se observa un aumento de la degradación y la fragmentación de estos componentes [Jacob 2003].

La actividad de las MMP y sus inhibidores han sido analizados en varios estudios comparando segmentos insuficientes y segmentos controles, así como su variación con la región anatómica de procedencia del segmento venoso, no observándose resultados coincidentes entre los diferentes estudios [Lim et al 2009].

Los trabajos orientados al estudio de la relación entre el ratio MMP/TIMP y la remodelación de la pared documentan un incremento significativo de la cantidad de TIMP-1, una cantidad similar de TIMP-2 y una disminución significativa de MMP-2 en venas insuficientes frente a controles, resultando en unos ratios TIMP-1/MMP-2 y TIMP-2/MMP-2 mucho más elevados en venas insuficientes que en venas controles, lo que favorece la acumulación de material de la MEC en la vena varicosa [Parra et al. 1998; Badier-Comander et al. 2000].

En la pared venosa, la activación de las células endoteliales induce un aumento significativo de determinadas citoquinas como el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) y del factor de crecimiento de fibroblastos básico que modulan las actividades de las MMP. El TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de componentes de la MEC, especialmente colágeno y elastina, disminuye la expresión de MMP y aumenta la expresión de los TIMP. Estos tres mecanismos, junto con el desequilibrio existente en el ratio TIMP/MMP que atenúa la acción proteolítica, podrían explicar el aumento de material de la MEC en las venas insuficientes [Badier-Commander et al. 2001; Jacob 2003; Woodside et al. 2003].

La serina proteinasa involucrada en el remodelado de la pared vascular es la elastasa que tiene como principal sustrato a la elastina, entre otros [Jacob 2003]. Aunque la actividad de la elastasa es característica del proceso de envejecimiento, se ha observado un incremento significativo de su actividad en venas insuficientes en sujetos de edad avanzada. Al mismo tiempo se observa una mayor expresión de la proteína-2 de unión al TGF- $\beta$  latente (LTBP-2) y del TGF- $\beta$ 1 en las áreas de mayor daño, en el subendotelio y en la capa media, lo que podría estar relacionado con un intento de estabilizar las transcripciones de elastina. Estos hallazgos sugieren que el desarrollo de la insuficiencia venosa implica una reestructuración del componente elástico de la pared venosa, como consecuencia de cambios en los mecanismos de transcripción de las células de las capas musculares [Buján et al. 2003].

Por otro lado, en las venas insuficientes se observa la desorganización y desconexión de las unidades elástico contráctiles (figura 8) [Somers et al. 2006; Naoum et al. 2007]. Algunos estudios encuentran este hecho fuertemente asociado con la apariencia hipertrófica de las células musculares lisas, concretamente con la presencia de múltiples caveolas cargadas de enzimas proteolíticas que al liberarse participan en la destrucción de los diferentes componentes de la matriz extracelular [Kockx et al. 1998; Elsharawy et al. 2007].



Figura 8. a. Patrón de elastina en vena sana. b. Patrón irregular de la elastina como consecuencia de la ruptura de unidades elástico contráctiles en vena insuficiente (flecha). Fuente: propia

#### 1.1.8.4.3. Las células musculares lisas en la vena insuficiente

La estasis sanguínea, característica de los estados de hipertensión venosa, disminuye el suministro de oxígeno a la pared del vaso, generando condiciones de hipoxia que dañan al endotelio, liberando vasoconstrictores como endotelina-1 y mediadores que afectan a las células musculares lisas, lo que ocasiona cambios de la pared venosa. La liberación de ET-1 por el endotelio estimula la aparición de mediadores bFGF y PDGF- $\beta$ , que con sus propiedades mitogénicas contribuyen a la proliferación de las CML [Michiels et al. 2000]. Además, en condiciones de hipoxia se ha observado la producción de trombospondina-1 (TSP1) por las células endoteliales, que amplifica la proliferación y promueve la migración de las CML desde la capa media a la íntima [Moura et al. 2007].

A su vez, el estímulo para la proliferación de las CML es compensado mediante la producción de monóxido de carbono por las CML, tratando disminuir la generación de PDGF- $\beta$  y ET-1 por la células endoteliales [Michiels et al. 2000].

Cuando las CML se exponen a factores de crecimiento, proliferan y se desdiferencian desde un fenotipo "contráctil" a un fenotipo "secretor", perdiendo su capacidad contráctil y aumentando su síntesis de material de la MEC. Algunos de estos factores de crecimiento también tienen propiedades quimiotácticas, de modo que cuando son liberados por el endotelio inducen la migración de la CML desde la capa media a la capa íntima. Toda esta dinámica resulta en la formación de la neoíntima y el engrosamiento de las capas íntima y media [Michiels et al. 2002].

La hipoxia no es el único factor involucrado en el remodelado de la pared venosa. También se ha observado la relación entre la tensión de cizallamiento en las células endoteliales y la expresión de los factores de crecimiento antes indicados. En estudios con ratas se ha observado que la tensión de cizallamiento inhibe la proliferación de células vasculares en la neoíntima. Mientras que la existencia una tensión de cizallamiento no uniforme induce una mayor presencia de factores de crecimiento, que resulta en la formación de patrones de células y en la influencia en la dirección de migración de las CML [Liu et al. 2003].

Sin embargo, también se ha descrito que el engrosamiento de la capa íntima podría ser un fenómeno relacionado con el envejecimiento, de manera que las alteraciones de las CML de la íntima podrían no ser síntomas del desarrollo de la enfermedad venosa, sino más bien cambios compensatorios propios de la edad para hacer frente a los incrementos de presión/volumen en la pared [Somers et al. 2006].

Puesto que los niveles hormonales de estrógenos cambian durante el embarazo y la menopausia, la alteración en los patrones de expresión hormonales también ha sido considerado un mediador potencial en los cambios de las CML de la capa media. Estas observaciones se han correlacionado con la diferente expresión de receptores estrogénicos beta (ER $\beta$ ) en las CML de la capa media en comparación a las CML de la capa íntima, lo que sugiere que los cambios hormonales podrían inducir una respuesta hipertrófica de las CML de la capa media en las venas [Knaapen et al. 2005; Somers et al. 2006]. Esta respuesta hipertrófica ha sido observada en proyecciones citoplásmicas electrolucentes, en forma de vesículas o microherniaciones que brotan de las CML, que contienen elementos contráctiles (microfilamentos y microtúbulos) redundantes en las CML de las venas insuficientes [Wali et al. 2001; Elsharawy et al. 2007].

Estas microherniaciones parecen estar involucradas en la anteriormente indicada desorganización y desconexión de las unidades elástico contráctiles, características de las venas insuficientes [Kockx et al. 1998; Elsharawy et al. 2007].

La figura 9 recoge de forma gráfica todos los factores involucrados en los cambios observados en la pared de la vena insuficiente. El aumento de la presión sanguínea y la hipoxia activan las células del endotelio que liberan vasodilatadores que relajan la pared, y diferentes mediadores (ICAM-1, VCAM-1) que incrementan la adhesión de neutrófilos al endotelio y su posterior infiltración, pudiendo desarrollar úlceras venosas; otros mediadores (PDGF y ET-1) inducen cambios en las CML, proliferación y migración desde la capa media a la íntima, provocando un engrosamiento intimal. Además, los neutrófilos activados liberan quimioatrayentes (leucotrienos- $B_4$ ) que amplifican la respuesta inflamatoria, así como proteinasas y radicales libres derivados del oxígeno, que degradan y reestructuran la MEC. También se observa una remodelación de la pared debido a la hipertrofia de las CML como consecuencia de estímulos hormonales [Somers et al. 2006].



Figura 9. Factores involucrados en el desarrollo de venas insuficientes [Somers et al. 2006]

# 1.1.8.5. El papel de la apoptosis en el desarrollo de la insuficiencia venosa

Otro de los mecanismos que influye en la estructura de la pared venosa insuficiente es la desregulación de la apoptosis en las células musculares lisas. La desregulación parece ser la responsable de la desdiferenciación o cambio de un fenotipo contráctil a un fenotipo secretor, lo que conduce a una fibrosis irregular y un reordenamiento de la pared de la vena insuficiente [Jurukova et al. 1982].

Existen 2 modos principales de activación de la apoptosis: la vía intrínseca (inducción mitocondrial) y la vía extrínseca (inducción transmembrana). Ambas vías son reguladas por una secuencia de activación de diferentes caspasas que conducen a la ruptura de proteínas y a la activación de la fragmentación de ADN (figura 10). La vía intrínseca se produce por estímulos intracelulares que activan proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, que forman poros en la membrana mitocondrial modificando su permeabilidad, lo que facilita la liberación de factores inductores de la apoptosis, como el Citocromo C. El Citocromo C liberado en el citoplasma se une al factor de activación de la apoptosis (Apaf-1) para formar un complejo llamado apoptosoma, que produce la activación de la caspasa 9, que en última instancia activa las caspasas 3 y 7 que lleva a la muerte celular. La activación de la vía mitocondrial está regulada por proteínas antiapoptóticas, como Bcl2 y BclXL, que impiden la activación de las proteínas proapoptóticas. La permeabilidad mitocondrial se determina por el balance entre miembros pro y anti-apoptóticos en la membrana. La vía extrínseca se inicia por la unión de los llamados receptores de muerte (Fas o TNFR-1) a determinadas proteínas extracelulares (ligandos Fas (FasL) o factores de necrosis tumoral (TNF)) en la membrana plasmática de la célula, lo que desencadena la activación de la caspasa 8. Estas moléculas conllevan

a muerte celular producto del procesamiento directo de otras proteasas de la misma familia, como la caspasa-3 [Basu et al. 1998; Shimizu et al. 1999; Chowdhury et al. 2006; Wallach et al. 2008].



Figura 10. Vías de la apoptosis [Lim et al. 2009]

La desregulación de la apoptosis en las venas insuficientes está mediada a través de la vía intrínseca, con disminución significativa de Bax y caspasa-9 en las células de venas insuficientes respecto a controles. Las diferencias observadas en la vía extrínseca (Fas, caspasa-8) entre células de venas insuficientes y controles no son significativas [Ducasse et al. 2008; Lee et al. 2009; Lee et al. 2010]. Parece que en la desregulación de la apoptosis está involucrado el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que además de ser un regulador central de la respuesta inmune innata y adaptativa, es un factor de transcripción anti-apoptótico, aunque bajo ciertas circunstancias, este factor NF- $\kappa$ B podría contribuir positivamente a la inducción de la apoptosis [Grimm et al. 1996; Karin et al. 2002]. Muchas enfermedades comunes como el cáncer, la arteriosclerosis y la diabetes mellitus, también se asocian con la desregulación de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B. Esa vía del NF- $\kappa$ B puede jugar un papel importante en el desarrollo de venas insuficientes [Simovart et al. 2011].

El papel de la apoptosis en las células musculares lisas en las venas insuficientes es controvertido; algunos autores refieren disminución del número de células musculares

lisas apoptóticas en las venas insuficientes en comparación con venas normales [Jurukova et al. 1982; Ascher et al. 2000; Ascher et al. 2001; Ducasse et al. 2008]. Por el contrario, otros autores refieren el incremento de la apoptosis en las CML [Buján et al. 2000]. Se han comunicado valores apoptóticos de hasta el 88%, pero que muchos autores creen sobreestimados por errores en la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick End Labeling) de detección de células apoptóticas. La técnica TUNEL es sensible y necesita un ajuste cuidadoso en el pre-tratamiento proteolítico y en las concentraciones finales de TdT, para evitar falsos marcados de núcleos no apoptóticos. Los núcleos que muestran elevados signos de activación genética mediante la técnica de TUNEL podrían sobreestimar el verdadero índice de apoptosis [Kockx et al. 2000; Somers et al. 2006].

En las venas insuficientes, la desdiferenciación de las CML de un fenotipo contráctil a uno secretor da lugar a una heterogeneidad en la expresión proteica en las CML, y por lo tanto a un desequilibrio en la síntesis de ARN, lo que también explicaría falsos niveles de apoptosis indicados con la técnica de TUNEL [Porto et al. 1998; Badier-Commander et al. 2001]. Por otro lado, proteínas pro-apoptóticas como Bax y PARP (poly-ADP ribose polymerase) tienen disminución en su regulación, no pudiendo detectarse incrementos mediante TUNEL en venas insuficientes [Ascher et al. 2000; Ascher et al. 2001].

La edad puede ser también un factor de confusión en la apoptosis. El envejecimiento aumenta la sensibilidad de las células a la apoptosis [Hoffmann et al. 2001]. Se ha comunicado un aumento del índice apoptótico en las venas insuficientes de pacientes menores de 50 años [Urbanek et al. 2004]. Por el contrario, otros autores han observado un aumento del número de células apoptóticas (células endoteliales y células musculares lisas) en las paredes de venas insuficientes al aumentar la edad (>50 años) [Aunapuu et al. 2005; Simovart et al. 2011]. Este aumento puede ser el resultado de dos procesos: el primero es un aumento de la sensibilidad a la apoptosis inducida por el envejecimiento, y el segundo es el curso de la larga duración de la EVC que puede conducir a mayor patología en etapas más avanzadas. Este fenómeno es contradictorio, ya que existen pocos estudios de apoptosis en células musculares lisas de venas normales, que refieren mayor número de fenómenos apoptóticos en comparación con venas insuficientes con el aumento de los años; mientras que en las células endoteliales sucede lo contrario [Simovart et al. 2010].

El aumento de apoptosis en las células endoteliales observado en grupos de mayor edad, puede dar lugar a una pérdida del revestimiento endotelial con activación de las cascadas de señalización inductoras de la migración y proliferación de las CML a la capa subendotelial con la síntesis de grandes cantidades de MEC [Watanabe et al. 2001].

Por lo tanto, la presencia de una vía de apoptosis implicada en la reordenación de la pared de la vena insuficiente es controvertida. La remodelación de la capa íntima y la capa media no sólo está influenciada por mediadores de la reestructuración de las CML

sino que también se involucran estímulos hormonales que inducen hipertrofia de estas células [Somers et al. 2006].

## 1.1.9. El procesado digital de imágenes histológicas en el estudio de la enfermedad venosa crónica

Desde un tiempo a esta parte se ha producido una mayor disponibilidad de capacidad de cómputo en los ordenadores ofreciendo unas prestaciones muy elevadas para el procesamiento gráfico y científico. Junto a ello, el desarrollo de mejoras de los algoritmos para el análisis de imágenes y la disponibilidad de técnicas de aprendizaje automático ha propiciado el desarrollo de potentes herramientas de ordenador para el análisis de datos biomédicos, siendo la histopatología una de las ramas de la patología donde el desarrollo de estas técnicas ha tomado un impulso considerable [Madabhushi 2009].

En la figura 11 se muestra la evolución del número de publicaciones indexadas en la base de datos PubMed, que contienen las palabras "image analysis" o "image processing", y que simultáneamente incluyen los términos "histology" o "histophatology".



Figura 11. Evolución del número de publicaciones indexadas en el PubMed conteniendo los términos "image analysis" o "image processing", y simultáneamente el término "histology" o "histophatology". Fuente: PubMed

Como consecuencia se ha dedicado una mayor cantidad de esfuerzo y recursos para el desarrollo de métodos basados en ordenadores de ayuda al diagnóstico, dando lugar a lo conocido como Diagnósticos Asistidos por Ordenador (DAO), o más conocido por sus siglas en inglés CAD (computer aided diagnosis), que constituyen una ayuda para la elaboración de diagnósticos en base a información multimedia obtenida de pruebas a las que se ha sometido el paciente, o en el caso de la histopatología a partir de las imágenes de los tejidos obtenidos por biopsia.

Habitualmente se trabaja con imágenes en color resultado de tinciones básicas tradicionales, pero en ocasiones se utilizan técnicas como la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia, en las que se emplean marcadores que resaltan la presencia de determinadas moléculas en el tejido analizado. Recientemente se ha documentado el uso de imágenes hiperespectrales, que con ayuda de sensores específicos y técnicas no invasivas recogen información a lo largo de todo el espectro electromagnético y no sólo del espectro visible al ojo humano. Las diferentes imágenes recopilan información de una banda específica del espectro, y su combinación forma una imagen tridimensional [Gurcan et al. 2009].

El diagnóstico realizado por los patólogos es subjetivo y susceptible de sufrir variaciones entre diferentes observadores, por lo que el proceso de cuantificación realizado sobre estas imágenes es un aspecto crucial para obtener diagnósticos objetivos. Y en esta dirección se han venido desarrollando algoritmos automáticos de análisis de imágenes asistidos por ordenador para la cuantificación de algunas características de las imágenes, que ayuden a los patólogos en la interpretación del conjunto de imágenes histopatológicas. Estas técnicas de ayuda al diagnóstico se han venido desarrollando en dos direcciones [Belsare et al. 2012]:

1. *Técnicas de procesamiento y análisis de imágenes*: el diagnóstico de una enfermedad mediante imágenes histopatológicas requiere la identificación de estructuras y la cuantificación de algunas de sus características morfológicas como tamaño, forma, color, etc.

En este sentido las técnicas de procesamiento de imágenes facilitan esta labor tratando, en primer lugar, de mejorar la calidad de la imagen mediante un preprocesamiento de la misma, eliminando posibles variaciones irregulares de color y luminosidad fruto del proceso de tinción, o eliminando estructuras ajenas al objetivo del estudio como manchas, polvo, pliegues, etc. que pueden interferir en los resultados.

En segundo lugar se persigue identificar y separar los objetos de interés del resto de la imagen mediante los denominados *métodos de segmentación*, para finalmente cuantificar algunas de sus características como tamaño, perímetro, longitud, forma, etc.

2. *Técnicas de aprendizaje automático*: que comprenden algoritmos automáticos que en función de las características de la imagen, observadas y cuantificadas, permiten clasificar la imagen dentro de un conjunto de clases preestablecido, facilitando el diagnóstico final.

Entre estas técnicas las más habituales son los modelos de regresión logística, las redes neuronales, las máquinas de vectores soporte, etc.

Las técnicas se basan en generar un modelo que a partir de un conjunto de valores de entrada genere de forma automática un resultado clasificatorio, por ejemplo, la estadificación de un cáncer basado en el tamaño o extensión del tumor original en las imágenes de una biopsia. El proceso de generación del modelo depende de la técnica de aprendizaje empleada, y aunque cada una tiene sus particularidades, generalmente se basan en "entrenar" o ajustar el modelo a partir de imágenes patrones.

Los DAO proporcionan una ayuda al diagnóstico en base a un análisis cuantitativo y objetivo de las imágenes de una biopsia, con ayuda de las técnicas mencionadas. En la figura 12 se muestra el conjunto de pasos que un sistema DAO debería llevar a cabo para la emisión de un diagnóstico clínico a partir de las imágenes de las muestras obtenidas de una biopsia [Kothari et al. 2013].



Figura 12. Pasos para un sistema de diagnóstico clínico basado en el análisis de imágenes de muestras de biopsia [Kothari et al. 2013]

Los algoritmos y técnicas aplicados en cada paso dependen, necesariamente, de la especialidad médica a la que se dirijan debido a las diferentes características de la imagen en cada campo de estudio. Así, por ejemplo, las imágenes histológicas son a color con multitud de objetos de interés incluidos y tomadas con un nivel de zoom ampliado, mientras que las imágenes radiológicas solo muestran tonalidades de gris con uno o dos objetos en ellas. Además, las imágenes histológicas pueden verse afectadas por diversos factores que dificultan su análisis, como tejidos superpuestos, pliegues, variaciones de color y luminosidad, desenfoque de zonas de la imagen, etc. Sin embargo, los sistemas de análisis de imagen para estos dominios comparten procedimientos comunes en el procesamiento, que generalmente consisten en la secuencia de pasos indicados en la figura 12.

El consenso existente sobre la importancia del análisis cuantitativo de las imágenes histopatológicas no sólo se deriva desde una perspectiva clínica para reducir o eliminar las variaciones diagnósticas entre diferentes patólogos, sino que tiene aplicación inmediata en la investigación, por ejemplo para facilitar la comprensión de los mecanismos biológicos del proceso de una enfermedad [Gurcan et al. 2009].

En el área concreta de las enfermedades venosas, el análisis digital de la imagen se ha empleado en estudios histológicos de investigación para la cuantificación de algunas medidas de interés en secciones de venas, aunque son escasas las publicaciones que detallan los algoritmos de procesamiento y análisis de imágenes empleados. Se han encontrado referencias al método de segmentación basado en el valor umbral para la medida de fibras elásticas [Porto et al. 2002], al uso de rangos de colores en el modo de color HSI (tonalidad, saturación, intensidad) para la identificación de componentes de la pared venosa [Urbanek et al. 2004], y al método de deconvolución de color [Ruifrok et al. 2001] utilizado en la aplicación web *ImmunoRatio* para la cuantificación del marcador Ki67 [Tuominen et al. 2010], entre otros.

#### 1.2. EL PROCESADO DIGITAL DE IMÁGENES

El procesado digital de imágenes pretende mejorar la calidad de una imagen para facilitar la observación de determinados detalles, de modo que el resultado de cualquier operación de procesado digital siempre será otra imagen. El procesado digital es un paso previo al análisis de la imagen, que es donde se extrae la información cuantitativa de la imagen [Pertusa 2010].

Todo el proceso comienza con una imagen digital, que es el resultado de una imagen real capturada mediante un dispositivo con un número finito de sensores, y cuyos valores capturados son cuantificados en una escala discreta para ser visualizados o almacenados en un archivo.

#### 1.2.1. Imágenes digitales

Una imagen digital se encuentra formada por un conjunto finito de puntos, denominados píxeles, que generalmente se organizan en forma de matriz con un determinado número de filas y columnas.

Cada píxel de la imagen es codificado internamente en el ordenador mediante un valor numérico, habitualmente entre 0 y 255 (256 valores). En el caso de imágenes en blanco y negro, los dos únicos posibles valores que puede tomar un píxel son el 0 o el 255, equivalentes al negro y blanco puro respectivamente. En el caso de imágenes en escala de grises cada píxel puede tomar cualquier valor en el rango antes indicado, lo que representa 256 tonalidades de gris (incluyendo el blanco y el negro). La posición de cada píxel en una imagen se determina mediante dos coordenadas (x,y), que se corresponden con la fila y columna respectivamente de una determinada posición de la matriz. En la figura 13 se muestra la convención para el uso de la coordenadas, donde el píxel (7,3) contiene el valor 72. Las coordenadas (1,1) corresponden con el píxel de la imagen situado en la esquina superior izquierda.

(x,y)			$\rightarrow y$						
		1	2	3	4	5	6	7	8
	1	0	0	1	1	1	3	1	0
↓ ×	2	1	0	70	74	69	127	1	1
^	3	0	0	74	91	76	99	0	1
	4	0	4	76	76	76	76	77	0
	5	0	61	76	76	75	76	73	0
	6	0	10	77	76	77	77	23	0
	7	0	0	72	80	77	87	1	0
	8	0	0	1	2	16	0	1	1

Figura 13. Sistema de coordenadas de la matriz de una imagen

Las imágenes en color se organizan en varias matrices, cada una de las cuales almacena información sobre una componente de color. El color de cada píxel se forma combinando la información de las componentes de color almacenada en cada una de las matrices antes citada. Para la codificación de esta información existen varios formatos estándar que abarcan todos los colores posibles denominados *modos de color*, siendo los más comunes RGB, HSV, HSI, L\*a\*b\*, etc.

El modo de color más extendido es el RGB, que codifica el color de un píxel mediante 3 valores que corresponden a la cantidad de color rojo (R), verde (G) y azul (B). Esta cantidad es un número entero comprendido entre 0 (ausencia de color) y 255 (cantidad máxima). Así un color RGB se describe mediante tres cifras, por ejemplo (196,92,46). La mezcla de los tres colores básicos (rojo, verde y azul puros) produce el color blanco (255,255,255), mientras que la ausencia de los tres colores produce el color negro (0,0,0).

La figura 14 muestra la estructura utilizada para almacenar una imagen en color. El acceso a cada componente se realiza especificando tres coordenadas (x,y,z), que se corresponden con la posición del píxel (x,y), y con una tercera dimensión z que identifica la matriz a la que se desea acceder. Si en la figura 14 se utiliza un modo de color RGB, la posición (5,1,1) contiene el valor 196 que se corresponde con la componente de color rojo, la posición (5,1,2) almacena el valor 92 de la componente de color verde, y la posición (5,1,3) almacena el valor 46 para la componente azul. El color del píxel en la posición (5,1) de la imagen será (196,92,46).



Figura 14. Coordenadas de la matriz de una imagen en color

Otro modo de color muy utilizado en la industria e investigación es el L\*a\*b\*, también denominado CIELab, donde el color es descrito mediante 3 valores: la luminosidad  $(L^*)$ , un valor en la gama de colores que va desde el verde al rojo  $(a^*)$  y un valor en la gama de colores que abarca desde el azul al amarillo  $(b^*)$ . El rango de variación de la luminosidad es de 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que los otros dos componentes varían entre los valores -120 a 120. En la figura 15 se muestra el sistema de codificación CIELab.



Figura 15. Codificación del color mediante el estándar CIELab. Fuente: Commission Internationale d'Eclairage (CIE)

Su popularidad radica en su uniformidad, esto es, la diferencia entre dos colores  $L^*a^*b^*$  es similar a la diferencia percibida por el ojo humano (el ojo humano es más sensible a los cambios de luz que a los cambios de color), por lo que la diferencia de percepción relativa entre dos colores se puede cuantificar como la distancia euclídea entre los componentes de cada uno de los colores [Leon et al. 2006].

## 1.2.2. Operaciones básicas con imágenes digitales

El procesamiento digital de imágenes consiste en la aplicación de algoritmos sobre las matrices numéricas que representan a las imágenes, y cuyo resultado es mostrado usando imágenes [Pertusa 2010].

## 1.2.2.1. Operaciones algebraicas

Dado que las imágenes son soportadas internamente mediante matrices, cualquier operación matemática que pueda realizarse sobre matrices es susceptible de ser aplicada sobre imágenes. Operaciones aritméticas y binarias con matrices, extracción de una porción de una matriz, búsqueda de la posición de un determinado valor en una matriz, el cálculo de la suma o valor medio de los valores almacenados en una matriz, etc. son directamente aplicables sobre imágenes.

En la figura 16 se muestra cada una de las componentes de color R, G y B de la imagen de una pared venosa, operación consistente en extraer una de las matrices de la imagen en color, de manera que la imagen resultante consta de una única matriz cuyos valores corresponden a una escala de grises en el rango [0,255], representando la intensidad de color de la componente extraída.



Figura 16. Componentes R, G y B de una imagen en color

## 1.2.2.2. Operaciones sobre imágenes en escala de grises

La operación más común consiste en aumentar el contraste, definido como el valor absoluto de la diferencia de los niveles de gris de la imagen.

Un caso particular es la *binarización* de la imagen, que da como resultado una imagen en blanco y negro. Cada píxel de la imagen original se cambia a blanco o negro de acuerdo a si supera o no un determinado valor denominado *umbral* o *threshold*. Todos los píxeles con un nivel de gris inferior al umbral se ponen a negro, mientras que si tienen un valor de gris igual o superior al umbral se ponen a blanco. Con esta operación se intenta resaltar algunas zonas de la imagen, aquellas regiones de la imagen cuyo nivel de gris sea superior a un umbral estipulado. En la figura 17 se muestra un ejemplo que pretende clarificar la descripción de esta operación.



Figura 17. Proceso de binarización con diferentes valores de umbral

Para la elección del valor umbral resulta muy útil visualizar un histograma de los niveles de gris de la imagen, como se muestra en la figura 18. En esta figura se puede identificar los valores de gris predominantes en los alrededores de 150 y 250, lo que se correspondería con una imagen con 2 tipos de zonas diferenciadas: la pared venosa y el resto de la imagen.



Figura 18. Histograma de niveles de gris de una imagen

La elección de un valor umbral entre los dos valores de gris predominantes en el histograma permite delimitar ambas zonas. En la figura 19 se muestra el resultado de la binarización con un valor de umbral igual a 200.



Figura 19. Binarización de la imagen de la figura 18

El resultado de la operación de binarización es una imagen en blanco y negro, donde cada píxel toma uno de dos valores posibles: "1" representando el color blanco o "0" representando el color negro, motivo por el que reciben el nombre de *imágenes binarias*.

Otra operación muy común es obtener el negativo de una imagen, consistente en asociar a cada píxel el valor resultante de restar al valor del color blanco (255) el valor actual del píxel. En el caso de imágenes binarias, esta operación convierte lo representado en color blanco en negro y viceversa.

## 1.2.2.3. Operaciones sobre imágenes binarias

Existen multitud de operaciones y funciones que pueden ser realizadas sobre imágenes binarias. Su disponibilidad depende del software de procesado de imágenes utilizado, de manera que sólo se indicarán aquellas más comunes y relacionadas con el trabajo aquí desarrollado.

Se denomina *componente conectado* (CC) a un área de la imagen cuyos píxeles contiguos comparten el mismo valor. La operación de búsqueda de CCs devuelve la imagen con los píxeles etiquetados, de manera que aquellos píxeles que forman un mismo CC tienen la misma etiqueta (un número entero). Generalmente se puede utilizar dos tipos de conectividad entre píxeles: conectividad-4 (parcial) o conectividad-8 (total). En la figura 20 se muestra un ejemplo de localización de CC con diferentes tipos de conectividad.

			_	 Conectividad-4				Conectividad-8							
						1	1						1	1	
					2							1			
				3			4				1			2	
						4	4	4					2	2	2
				5							3				

Figura 20. Localización de componentes conectados con diferentes tipos de conectividad

El uso de etiquetas en los CC permite individualizar cualquier operación posterior sobre un componente determinado, como por ejemplo su borrado, el cálculo de su área (en píxeles), el relleno de su interior, etc.

La extensión de un CC puede ser calculada contando los píxeles contenidos en el interior del componente, lo que es equivalente, en una imagen binaria, a sumar el valor de todos los píxeles del componente. El perímetro puede ser obtenido como el número de píxeles que bordean el objeto, entendiendo como píxel-borde aquel que tiene al menos un píxel vecino que no pertenece al objeto. Todas estas medidas son dependientes de la resolución de la imagen.

Las operaciones de *dilatación* y *erosión* permiten expandir/encoger los límites de los objetos, rellenar áreas de pequeño tamaño, erosionar pequeños salientes, etc. [Pertusa

2010]. El propio nombre de la operación, dilatación o erosión, describe el efecto resultante de su aplicación sobre las imágenes. La operación de erosión "desgasta" los límites de los objetos, mientras que la operación de dilatación hace lo contrario. Sin embargo, no son operaciones complementarias, en el sentido de que la erosión no es la inversa de la dilatación.

Estas operaciones se basan en la interacción de la imagen con lo denominado *elemento* estructurante. El elemento estructurante es normalmente de pequeño tamaño con forma de cruz, cuadrado o circular. La figura 21 muestra el resultado de la operación de dilatación y erosión sobre la imagen de la figura 19 con un elemento estructurante cuadrado de 5 píxeles de lado (el elemento estructurante actúa sobre las zonas de color blanco).



Figura 21. Resultado de la dilatación y erosión de la imagen de la figura 19

#### 1.2.3. Segmentación de imágenes

La segmentación de imágenes hace referencia a la tarea de identificar estructuras en la imagen basándose en ciertas características que permiten discriminar unas zonas de otras, y que constituyen los objetos de interés. Esta tarea es un paso previo necesario para realizar medidas sobre objetos presentes en cualquier imagen, como longitud, extensión, orientación, etc.

Existe una variedad de métodos de segmentación [Pertusa 2010]:

- Basados en el valor umbral, consistente en un proceso de binarización basado en un valor umbral correspondiente a una tonalidad de gris. La elección del valor umbral puede realizarse manualmente, aunque existen algoritmos, como el *algoritmo de Otsu*, que lo calculan automáticamente, minimizando la varianza entre los píxeles dentro de cada grupo (grupo de píxeles blancos y grupo de píxeles negros), mientras que maximiza las diferencias entre ambos grupos.
- Basados en la identificación de bordes/contornos. Los bordes son los límites entre objetos, o entre los objetos y el fondo de una imagen. Su correcta identificación permite la localización del objeto que contiene. Existe infinidad de

métodos para la detección de bordes, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, siendo la experimentación la que ayuda a determinar cuál es la mejor técnica para aplicar en cada caso.

- Basados en el crecimiento de regiones. A diferencia del anterior la delimitación del objeto comienza en un punto en el interior del objeto que se va expandiendo hasta alcanzar los límites o bordes del objeto.
- Basados en texturas. La textura viene definida por una relación regular entre píxeles próximos. Resulta en métodos bastante complejos debido a que se pueden encontrar varios tipos de textura, con distintos intervalos de brillo y diferentes orientaciones en una misma imagen.
- Algoritmos de agrupamiento, que tratan de agrupar píxeles similares entre sí, y lo más distintos a los existentes en el resto de grupos.
- Basados en el color, donde se seleccionan aquellos píxeles que cumplen unos criterios que hacen referencia a la información de color, como por ejemplo la segmentación por cortes de color que selecciona píxeles cuyo color se encuentra dentro de un rango de colores previamente definido.

De los métodos indicados vamos a presentar con detalle los algoritmos de agrupamiento y la segmentación por cortes de color que son los que, junto con los basados en el valor umbral, se utilizarán en este trabajo.

#### Algoritmos de agrupamiento

Los algoritmos de agrupamiento son técnicas automáticas empleadas para agrupar grandes volúmenes de datos o píxeles en un conjunto finito de grupos en base a la similitud existente entre los datos o píxeles.

El algoritmo de agrupamiento más utilizado es el conocido como algoritmo k-means [Witten et al. 2011], englobado dentro del tipo agrupamiento por particiones, donde se parte de un único grupo que incluye a todos los píxeles y que se subdivide en tantos cómo se deseen, en el que previamente es necesario especificar la cantidad de grupos que se desean formar (parámetro k) con el conjunto total de datos o píxeles.

Inicialmente el algoritmo escoge aleatoriamente k píxeles conocidos como *centroides*, cada uno de los cuales se supone representa a cada uno de los k grupos. A continuación, el resto de píxeles se van asignando al grupo con el que tenga más similitud, comparando el píxel con cada uno de los k centroides. El resultado es una primera distribución de todo el conjunto de píxeles en k grupos.

A partir de este punto el algoritmo consiste de un mismo conjunto de pasos que van refinando la formación de los k grupos. Se recalcula el centroide de cada grupo como el valor medio de los colores de los píxeles que lo componen. Con estos nuevos valores de los centroides se vuelve a reasignar los píxeles a cada uno de los k grupos. Este proceso se repite hasta que la composición de los grupos no cambia o cambia muy poco entre iteraciones contiguas.

En los algoritmos de agrupamiento basados en el color de los píxeles, la similitud entre dos píxeles de color se mide calculando la distancia euclídea entre las componentes de color de cada uno de los píxeles, que en el caso de codificación RGB es:

similitud de color = 
$$\sqrt{(R'-R)^2 + (G'-G)^2 + (B'-B)^2}$$
 (1.1)

interpretándose que a menor distancia euclídea entre los píxeles, mayor similitud entre ellos.

En la figura 22 se muestra un ejemplo de los conceptos expuestos. Adjunto a cada color se indica el valor de las componentes RGB, y en la columna de la derecha se indica el resultado del agrupamiento de los datos.

Datos	Gr	upos	Agrupamiento					
pix1 (227,88,45)	Gru	upo 1	similitud(pix1,c1)=46.02 similitud(pix1,c2)=248.26	pix1 a grupo 1				
pix2 (51,204,204)	centroide1	(240,78,88)	similitud(pix2,c1)=255.05 similitud(pix2,c2)=110.84	pix2 a grupo 2				
pix3 (67,104,255)	Gru	upo 2	similitud(pix3,c1)=241.86 similitud(pix3,c2)=122.49	pix3 a grupo 2				
pix4 (168,58,135)	centroide2	(149,195,255)	similitud(pix4,c1)=88.28 similitud(pix4,c2)=183.11	pix4 a grupo 1				
pix5 (255,68,108)			similitud(pix5,c1)=26.93 similitud(pix5,c2)=221.30	pix5 a grupo 1				

Figura 22. Ejemplo de agrupamiento entre colores en base a las componentes RGB

Es importante destacar que el resultado del algoritmo k-means depende del valor inicial asignado a los centroides, de manera que ante una misma imagen la composición de los grupos puede variar entre varias ejecuciones del algoritmo al variar la selección inicial de los centroides. Es una práctica habitual realizar varias ejecuciones del algoritmo con los mismos datos de entrada, y concluir como resultado final el mejor agrupamiento obtenido de entre todas las ejecuciones realizadas [Witten et al. 2011].

Las ventajas de la técnica de agrupamiento radica en que es un proceso automático (no requiere la intervención del usuario durante su ejecución), reproducible, objetivo y rápido.

Existen varios trabajos en el campo de la histología donde se utilizan las técnicas de agrupamiento, como por ejemplo para la detección de colágeno a nivel de la dermis [Miot et al. 2010], para la delimitación de la epidermis en imágenes histopatológicas [Xu et al. 2015], etc.

#### Segmentación por cortes de color

La segmentación por cortes de color permite resaltar ciertos rangos de color de la imagen, siendo útil para identificar objetos o áreas de un determinado color.

En el caso más sencillo se toma como base el color del objeto que se quiere localizar, denominado *color prototipo*, sobre el que se permite cierto grado de variación, es decir, se resalta un rango de colores centrado en el color prototipo y con un ancho configurable denominado *margen*.

Aquellos píxeles de la imagen con un color dentro del rango de colores de interés se resaltan con un color particular mientras que el resto se ponen a un color neutro. La pertenencia de un color al rango de colores de interés se decide calculando su similitud con el color prototipo, de igual forma que la indicada en los algoritmos de agrupamiento, es decir, mediante la distancia euclídea entre el color de un píxel y el color prototipo calculada mediante la expresión (1.1). Aquellos píxeles de la imagen cuya distancia con el color prototipo es menor que el valor del margen establecido son lo que se resaltan [Pertusa 2010].

Se puede encontrar la aplicación de esta técnica para la detección de fibra muscular, colágeno y elastina en imágenes de venas utilizando un modelo de color HSI [Urbanek et al. 2004], o como parte del análisis de técnicas inmunohistoquímicas [Jaén et al. 2005].

## 1.3. MÉTODOS ROBUSTOS DE ESTADÍSTICA INFERENCIAL

Una actividad ligada habitualmente al análisis de imágenes es el análisis estadístico de los datos numéricos obtenidos de dichas imágenes, lo que permite sintetizar, interpretar y procesar los datos cuantitativos con la finalidad de inferir propiedades de una población a partir de una pequeña muestra representativa de la misma.

La disponibilidad de los computadores y de programas estadísticos ha facilitado el análisis estadístico, existiendo una cada vez mayor proporción de publicaciones de investigaciones médicas que incorporan métodos estadísticos más allá de un *t*-test, un  $\chi^2$ -test o el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson [Altman 1991]. Pero al mismo tiempo se ha constatado un creciente número de publicaciones médicas que incluyen defectos, errores o deficiencias en el método estadístico [Strasak et al. 2007; Fernandes-Taylor et al. 2011].

La validez de las conclusiones de un estudio depende en gran medida de la utilización de métodos estadísticos apropiados, y ello requiere que se cumplan una o varias hipótesis. Sin embargo se ha observado que en las publicaciones científicas se proporciona poco o nulo detalle sobre el cumplimiento de los supuestos subyacentes de las técnicas estadísticas utilizadas [Erceg-Hurn et al. 2008; Hoekstra et al. 2012; Ghasemi et al. 2012].

Las publicaciones científicas relacionadas con el tema de este trabajo no son ajenas a las deficiencias anteriormente apuntadas, pudiéndose encontrar ejemplos donde se

utilizan métodos paramétricos (t-test, ANOVA de 2 vías) sin justificar el cumplimiento de los requisitos necesarios [Travers et al. 1996; Khan et al. 2000], o no se detalla el método estadístico utilizado para concluir los efectos significativos que se mencionan [Andreotti et al. 1979].

Los métodos estadísticos inferenciales tradicionales paramétricos y no paramétricos imponen ciertos requisitos a los datos sobre los que sustentan su validez, como la normalidad de la distribución de los datos, muestras con un tamaño mínimo, la homogeneidad de las varianzas, la similitud de las distribuciones a comparar, etc. Los métodos no paramétricos requieren menos supuestos que los métodos paramétricos, y aunque no requieren supuestos sobre la distribución de probabilidad de la población, muchas pruebas no paramétricas son sensibles a la forma de las poblaciones de las que se extraen las muestras [Pett 1997].

El incumplimiento de los requisitos exigibles en cada caso tiene una influencia directa en los resultados, en particular altera el error tipo I y disminuye la potencia del test, lo que puede conducir a valores de significación estadística (valor de p) no correctos [Erceg-Hurn et al. 2008].

Cuando se dispone de muestras de tamaño pequeño no resultan válidas las pruebas de verificación de ajuste a la distribución normal, pues muestran una tendencia a aceptar la hipótesis nula de normalidad en la muestra, incluso cuando los datos no presentan gráficamente dicho comportamiento [Pett 1997]. Por otro lado, el desconocimiento de la normalidad de los datos impide la aplicación de los test de igualdad de varianzas (homocedasticidad) que suponen que los datos están distribuidos normalmente, lo que en definitiva impide verificar el cumplimiento o no de los requisitos exigibles por los métodos tradicionales [Erceg-Hurn et al. 2008].

La importancia de lo anteriormente apuntado puede observarse en la siguiente cita literal [Wilcox 1998, p. 300]:

"In particular, arbitrarily small departures from normality result in low power; even when distributions are normal, heteroscedasticity can seriously lower the power of standard ANOVA and regression methods. The practical result is that in applied work, many non significant results would have been significant if a more modern method, developed after the year 1960, had been used."

Una posible estrategia sería utilizar siempre pruebas no paramétricas, ya que si se cumplen los requisitos paramétricos la pérdida de potencia no es muy grande.

Otra alternativa es la utilización de los llamados métodos robustos, que se muestran superiores a los no paramétricos clásicos, y que no requieren los supuestos de aplicación de las pruebas paramétricas. Los métodos estadísticos robustos se caracterizan por su validez aún cuando los datos no sean normales y no homocedásticos. En definitiva, los métodos estadísticos robustos son aplicables y proporcionan resultados válidos tanto si los requisitos clásicos se cumplen como si no se cumplen [Erceg-Hurn et al. 2008].

## 1.3.1. Técnicas de remuestreo

Las técnicas estadísticas de remuestreo se engloban dentro de los métodos robustos para inferencia estadística, siendo una alternativa cuando los datos no cumplen los requisitos para la aplicación de métodos paramétricos o no paramétricos, o bien cuando se desea inferir el valor de un parámetro poblacional para el que los métodos tradicionales no ofrecen ningún procedimiento o función [Moore et al. 2010].

Las técnicas de remuestreo permiten cuantificar valores como errores estándar, intervalos de confianza, etc., así como realizar test de significación. Exigen menos requisitos a los datos que los métodos tradicionales, y generalmente son más robustos en términos de potencia y errores de tipo I [Moore et al. 2010].

De forma resumida, las técnicas de remuestreo basan el proceso de inferencia en la variabilidad presente en la muestra disponible de datos, en lugar de una determinada suposición sobre la distribución de la población de donde fue extraída la muestra. Para ello, la muestra original de los datos es *muestreada* para generar nuevas muestras de datos del mismo tamaño que la original (de aquí se deriva el nombre de remuestreo). El estadístico de interés se calcula para cada una de estas nuevas muestras, obteniéndose la distribución muestral del estadístico. En la figura 23 se ilustra mediante un ejemplo la idea aquí expuesta, particularizada para una muestra de 8 datos, y escogiendo la media aritmética como el estadístico de interés.



Figura 23. Idea general de las técnicas de remuestreo

La variabilidad de los resultados es inversamente proporcional a la cantidad de remuestreos realizados, requiriendo para ello de una gran potencia computacional y recursos de memoria, motivo por el que no han venido siendo utilizados en el pasado [Good 2005]. De hecho, el tiempo de ejecución de estas técnicas puede llegar a emplear actualmente minutos, horas o incluso días de cómputo dependiendo de las magnitudes del problema a resolver. Para disminuir el tiempo de computo las técnicas de remuestreo trabajan con un subconjunto de todo el espacio posible de remuestreos, siendo el tamaño de este subconjunto N un compromiso entre la precisión deseada y el tiempo de cómputo necesario.

Entre las técnicas de remuestreo se incluyen [Good 2005]:

• **Test de permutación** (también conocidos como *test de aleatorización*): utilizados principalmente para el contraste de hipótesis. Bajo la hipótesis nula de igualdad del estadístico en estudio, los datos de las muestras pueden fusionarse en un único grupo que se remuestrea *sin reemplazo* a fin de obtener conjuntos de datos del mismo tamaño que los grupos originales, sobre las que se calcula el estadístico de prueba que permita discriminar entre la hipótesis nula y alternativa.

El valor de p se obtiene comparando el valor del estadístico observado en los grupos de datos originales con la distribución muestral del estadístico generada.

• **Bootstrap**: se utilizan generalmente para obtener intervalos de confianza de un determinado parámetro poblacional. Parte de una única muestra de datos que es considerada como si fuera la población, y a partir de ella extraer múltiples muestras del mismo tamaño que la original mediante remuestreo *con reemplazo*, calculando sobre cada una de ellas el estadístico de interés deseado.

A partir de la distribución muestral del estadístico se puede estimar la variación del estadístico (error estándar) de manera sencilla, y obtener el intervalo de confianza del parámetro poblacional. Existen varios métodos para la obtención de los límites del intervalo de confianza a partir de la distribución muestral generada [Moore et al. 2010]:

- *Método percentil*, que considera el intervalo de confianza como el existente entre el percentil  $\alpha/2$  y el percentil  $(1-\alpha/2)$  de la distribución muestral del estadístico, siendo  $\alpha$  el nivel de significación escogido.
- *Método BCa* (intervalo de sesgo corregido y acelerado) que tiene en consideración el sesgo y la variabilidad de los remuestreos, aunque requiere más tiempo para su cálculo.

# 2. JUSTIFICACIÓN
En el capítulo "Introducción" se ha realizado una breve exposición de diferentes aspectos de la enfermedad venosa. Entre los puntos expuestos destacan dos: el que hace referencia al análisis histopatológico básico (cambios estructurales de la pared venosa insuficiente) y el apartado en el que se expone la metodología general de análisis digital de la imagen. La fusión de ambos puntos, junto con la metodología empleada para la obtención de las muestras, justifican y soportan contundentemente, a nuestro juicio, la presentación de este trabajo.

La utilización del análisis digital de la imagen en múltiples facetas de la investigación básica es relativamente reciente. En el capítulo "Introducción" se ha señalado la existencia de diferentes programas que permiten cuantificar adecuadamente la presencia de marcadores en las muestras histológicas (ImageJ (distribución Fiji), R (paquete BiOps), Matlab, Image Pro Plus, etc.), pero también se ha puesto de manifiesto la escasa versatilidad de algunos de ellos al no permitir al investigador corregir los parámetros de manera que pueda obtener mayor y mejor información de las muestras objeto de estudio.

Por otro lado, entendemos que la metodología estadística que se usa habitualmente y que está basada en los métodos paramétricos y no paramétricos clásicos que han sido desarrollados para muestras de gran tamaño que cumplan unos requisitos, no resulta aplicable a los trabajos en los que el número de sujetos estudiados es pequeño (ver tabla 26), al no poder verificar correctamente el cumplimiento de los requisitos.

En relación a los métodos empleados hasta el momento, es muy interesante la afirmación de Janowski al reconocer la necesidad de utilizar métodos cualitativos basados en anotar la impresión del examinador (presencia baja, media o alta de las fibras colágenas) ante la dificultad de calcular con precisión el número de fibras presentes [Janowski et al. 2007]. Es decir, se utiliza la subjetividad del observador para obtener conclusiones. Por ello, con la finalidad de minimizar los errores, tradicionalmente se ha recurrido a que varios investigadores analicen las muestras y posteriormente se aúnen sus resultados.

También se han empleado métodos objetivos, como el análisis esteorológico proyectando imágenes sobre una superficie plana en condiciones estándar, lo que permite medir distancias (grosores) y áreas de manera objetiva [Travers et al. 1996].

Por último, y en relación a la utilización de los métodos de cuantificación para valorar la afectación de la pared de la vena en la insuficiencia venosa crónica, muy recientemente se ha empleado el análisis digital de la imagen mediante la utilización del programa ImageJ; desgraciadamente, al tratarse aún de una comunicación a un congreso, no tenemos acceso ni a la metodología empleada ni a los resultados obtenidos por los autores [Velasco-Martín et al. 2013].

Por tanto, bajo nuestro punto de vista, queda justificado el desarrollo del presente trabajo bajo la premisa de intentar desarrollar una metodología que permita al investigador cuantificar y comparar el parámetro estudiado en la pared de la vena insuficiente de manera fiable. Junto a este objetivo fundamental, ya reflejado en el título del trabajo, se trata de aprovechar el estudio para aportar nuevos datos referidos a los cambios que se producen en la estructura de la pared de las venas insuficientes.

Desde el punto de vista clínico, la simple inspección física puede decirnos que un paciente presenta insuficiencia venosa por la presencia de varices. Sin embargo, si queremos colocar al paciente en la categoría adecuada según la clasificación de la CEAP, es necesario recurrir a la exploración con eco-Doppler pues es la herramienta que, de manera no invasiva, permite saber con exactitud la extensión e intensidad del reflujo.

Observando la tabla 26 vemos que en muchos casos se analizan muestras procedentes de pacientes con insuficiencia venosa frente a muestras controles. Estos controles proceden bien de cadáveres o bien de sujetos que han padecido traumatismos o que son sometidos a cirugía coronaria y requieren de la obtención de safenas internas para realizar injertos arteriales. En tales casos suele emplearse solo la evidencia clínica (no presentar varices) para estimar que la safena interna no es insuficiente, lo cual no puede afirmarse de forma absoluta. Basta citar como ejemplo los hallazgos de Elsharawy et al. (2007) quienes encontraron que la unión safenofemoral del 20.8% de los sujetos integrantes de su muestra, todos con insuficiencia venosa demostrada por eco-Doppler, era competente.

Son escasos los estudios en los que se comparan muestras obtenidas en diferentes regiones de los mismos sujetos. En este sentido cabe señalar dos trabajos publicados: el primero de ellos es el estudio de Travers et al. (1996), en el que se comparan muestras tomadas a nivel de la ingle con muestras tomadas cerca de la rodilla, en el que se especifica que se ha demostrado la presencia de reflujo (sin mencionar si se objetivó mediante Doppler continuo o mediante eco-Doppler); el segundo, aunque no compara varias muestras del mismo sujeto, creemos que es superponible a este planteamiento puesto que la muestra de safena interna utilizada estaba libre de reflujo, aunque el paciente presentaba dilataciones varicosas [Gandhi et al. 1993].

En el resto de trabajos referenciados en la tabla 26 en los que se especifica que se han comparado muestras de segmentos competentes e incompetentes no hay evidencia de que esta circunstancia se haya determinado mediante el empleo de métodos objetivos.

De igual manera que con respecto al punto del análisis de la imagen cabe preguntarse: iPor qué es importante comparar segmentos competentes frente a segmentos incompetentes de un mismo paciente? La respuesta se nos presenta obvia: ya hemos puesto de manifiesto que la tendencia general es a pensar que múltiples factores inciden sobre la pared venosa y que mediante diferentes mecanismos pueden alterar su estructura y sus propiedades mecánicas, conduciendo a la dilatación y la insuficiencia valvular. Sin embargo no se conoce fehacientemente si los cambios en la pared venosa son previos a la existencia de reflujo e hipertensión venosa (reflujo presente) o si son secundarios al mismo. La única manera que tenemos de comprobarlo es mediante la comparación de muestras sometidas a reflujo frente a otras libres del mismo.

# 3. OBJETIVOS

#### **3.1. OBJETIVOS**

El objetivo general del trabajo es la aplicación de un método de cuantificación, basado en el análisis digital de imágenes, para realizar un estudio comparativo de la estructura de la pared de segmentos venosos competentes e incompetentes procedentes de pacientes con enfermedad venosa crónica y compararlos, a su vez, con segmentos de venas sanas.

Los objetivos específicos incluyen:

- 1. Explorar métodos de procesado digital de imágenes que permitan la cuantificación fiable de tinciones habituales de histoquímica e inmunohistoquímica en el análisis de la pared venosa.
- 2. Explorar métodos estadísticos de inferencia y contraste de hipótesis para el análisis de los datos numéricos obtenidos de la pared venosa, aplicables con muestras de tamaño pequeño.
- 3. Analizar estructural y morfométricamente las capas constituyentes de la pared de la vena insuficiente de segmentos competentes e incompetentes del mismo sujeto.
- 4. Determinar si los cambios estructurales que se producen como consecuencia de la competencia e incompetencia del segmento venoso son diferentes en función del segmento anatómico analizado y su estado hemodinámico.
- 5. Determinar la influencia de las variables edad y sexo sobre la estructura de las venas de pacientes con enfermedad venosa crónica.
- 6. Plantear una metodología que permita al investigador cuantificar, de manera cómoda, fiable y objetiva, componentes estructurales de la pared venosa utilizando tinciones habituales de histoquímica, mediante herramientas de fácil acceso, y si éstas son también válidas para la obtención de datos objetivos utilizando técnicas inmunohistoquímicas.

## 3.2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis principal de trabajo que se pretende evaluar en este estudio, mediante la aplicación de una metodología de cuantificación basada en el análisis digital de imágenes, es:

La presencia o ausencia de reflujo en la vena insuficiente determina la modificación de sus elementos estructurales. A partir de ella, planteamos varias hipótesis nulas y alternativas que son las siguientes:

- $H_0^{-1}$ : La presencia de reflujo venoso no es necesaria para la alteración estructural de la pared venosa insuficiente; es decir, la alteración de la pared venosa insuficiente precede al reflujo.
- $H_1^1$ : La presencia de reflujo venoso es necesaria para los cambios estructurales de la pared venosa insuficiente.
- $H_0^2$ : La presencia de reflujo no modifica la organización de los diferentes componentes estructurales de la pared venosa insuficiente.
- $H_1^2$ : La presencia de reflujo modifica la organización de los diferentes componentes estructurales de la pared venosa insuficiente.
- $H_0^3$ : No existe asociación entre las variables edad y sexo con la estructura de la pared venosa de pacientes con enfermedad venosa crónica.
- $H_1^3$ : Existe asociación entre las variables edad y sexo con la estructura de la pared venosa de pacientes con enfermedad venosa crónica.

# 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio analítico observacional de casos y controles, definido por dos poblaciones de pacientes: con insuficiencia venosa (casos) y sin la enfermedad (controles).

- a) Casos: Se seleccionaron 38 pacientes de ambos sexos (22 mujeres y 16 hombres), de edades comprendidas entre 24 y 70 años, sometidos a safenectomía interna con el diagnóstico de insuficiencia venosa primaria, previa obtención de consentimiento informado. Mediante análisis con ecografía Doppler color se identificaron los segmentos de vena sometidos a reflujo (incompetentes) y sin reflujo (competentes). Las zonas anatómicas analizadas fueron: cayado, muslo y pierna.
- b) Controles: El grupo control del estudio está constituido por 9 cadáveres de ambos sexos, de edades comprendidas entre 17 y 55 años, sin enfermedad venosa crónica, dato recogido de la historia clínica, en los que se extrajeron diferentes segmentos de vena safena interna a nivel de cayado, muslo y pierna, en el Instituto de Medicina Legal de Las Palmas, cumpliendo las normativas éticas y legales vigentes.

# 4.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE LOS SEGMENTOS VENOSOS

Previo a la intervención quirúrgica se examinó con ecografía Doppler el sistema venoso superficial de los pacientes de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1. El paciente permanece en bipedestación, de manera que la extremidad a explorar se presenta en discreta rotación externa y la rodilla semiflexionada. De esta forma, la musculatura de la extremidad se encuentra relajada.
- 2. Se procede a la exploración secuencial de toda la vena safena interna y de las tributarias insuficientes. Para determinar si un segmento es incompetente se selecciona el modo Doppler, el modo color, o ambos, en el ecógrafo y se comprime manualmente en una zona distal a la sonda (por ejemplo la pantorrilla, cuando exploramos en el muslo). De esta manera, visualizamos el flujo provocado por la compresión y prestamos atención a la posible presencia de reflujo. Cuando este reflujo es superior a 0.5 segundos se considera patológico [García-Gimeno et al. 2009].
- 3. Se toma nota de los segmentos insuficientes (unión safeno-femoral, tercio proximal del muslo, tercio medio del muslo, tercio distal del muslo, tercio proximal de pierna, tercio medio de pierna o tercio distal de pierna), de forma que dibujamos un mapa de los segmentos venosos insuficientes.

- 4. Se localizan las venas perforantes insuficientes, señalando su posición con la mayor precisión posible.
- 5. Una vez en quirófano, con la ayuda del ecógrafo, se procede a localizar los territorios venosos y se accede a ellos. Se practica una disección roma, lo más atraumática posible, para evitar lesiones de la pared y se extrae uno o varios segmentos de vena que se introducen inmediatamente en formaldehído. De esta manera sabemos con precisión si la muestra pertenece a un segmento competente o incompetente.

# 4.3. ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS

### 4.3.1. Procesamiento de las muestras

Todas las muestras, tanto casos como controles, fueron procesadas para el examen microscópico. Tras ser lavadas con suero fisiológico, fueron fijadas por inmersión en formaldehído al 10% y posteriormente procesadas para su inclusión en parafina, mediante método rutinario.

## 4.3.2. Estudios histoquímicos

Las tinciones utilizadas para el estudio de las muestras fueron tricrómico de Masson, tinción de Van Gieson y tinción de resorcina fucsina (modificación sin picrofucsina de Van Gieson).

Previo al proceso de tinción de las muestras, se obtuvieron secciones de 5 a 7 micras de espesor mediante microtomo.

La tinción tricrómico de Masson se escogió para la determinación de las células musculares lisas y la disposición de tejido conectivo presente en la pared de la vena, y las tinciones de Van Gieson y de resorcina fucsina para el estudio de fibras elásticas.

## 4.3.2.1. Tinción tricrómica de Masson

Tras la fijación de las muestras se siguió el siguiente procedimiento:

- Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas hasta llegar al agua destilada. Se trataron con líquido de Bouin durante 1 hora a 56-60°C y se dejaron enfriar, lavándose seguidamente con agua destilada. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina férrica durante 10 minutos, se lavaron en agua corriente durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada.
- 2. Posteriormente, las muestras se tiñeron con la solución de escarlata-fucsina ácida durante 15 minutos y más tarde se trataron con la solución de ácido

fosfomolíbdico-fosfotúngstico durante 10-15 minutos y se contrastaron con solución de azul de anilina o con solución verde claro durante 10 minutos.

- **3.** Se lavaron con agua destilada y diferenciaron con ácido acético al 1% durante 5 minutos.
- 4. Finalmente, las muestras se deshidrataron con posterior aclarado a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios cada uno, 2 minutos cada uno. El montaje se realizó en un medio resinoso.

#### 4.3.2.2. Tinción de Van Gieson

Para el estudio de fibras elásticas se empleó una tinción de Van Gieson (resorcina fucsina) y una tinción modificada de Van Gieson (sin picrofucsina). Como resultado de ambas tinciones se obtiene la coloración negra de las fibras elásticas.

#### 4.3.2.2.1. Resorcina fucsina

La técnica emplea el siguiente procedimiento:

- 1. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron y se pasaron por alcohol 70° durante 5 minutos y por alcohol 80° otros 5 minutos.
- 2. Se tiñeron con Resorcina Fucsina de Weigert durante 15 minutos y posteriormente se realizó un lavado rápido en agua destilada.
- 3. Después del lavado se tiñeron con Hematoxilina Férrica de Weigert unos 5 minutos y se volvieron a aclarar con agua destilada.
- 4. Se trataron con Picrofucsina de Van Gieson durante 2 minutos.
- 5. Se aclararon con alcohol de 96°.
- 6. Se deshidrataron y montaron con DPX.

# 4.3.2.2.2. Resorcina fucsina (modificación sin picrofucsina de Van Gieson)

La técnica consiste en el siguiente procedimiento:

- 1. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron y se pasaron por alcohol 70° durante 5 minutos y por alcohol 80° otros 5 minutos.
- 2. Se tiñeron con Resorcina Fucsina de Weigert durante 15 minutos y posteriormente se realizó un lavado rápido en agua destilada.
- **3**. Después del lavado, se tiñeron con Hematoxilina Férrica de Weigert unos 5 minutos y se volvieron a aclarar con agua destilada.
- 4. Finalmente se deshidrataron y se realizó el montaje en medio DPX.

#### 4.3.3. Estudios inmunohistoquímicos

Para el estudio inmunohistoquímico de las muestras se emplearon anticuerpos anti-CD68 para el estudio de células blancas (leucocitos), el anti-Ki-67 como marcador de proliferación celular, el anti-VEGF para el estudio de una posible angiogénesis y el anti-Elastina para el estudio del tejido elástico.

## 4.3.3.1. Determinación inmunohistoquímica de CD68

La molécula CD68 es una glucoproteína intracelular que se asocia principalmente con los gránulos citoplasmáticos y con las membranas de los macrófagos.

La determinación del marcador se utilizó para estudiar la presencia de células blancas en la pared venosa, fundamentalmente neutrófilos. El protocolo realizado fue el siguiente:

- 1. Desparafinado e hidratación de los cortes.
- 2. Bloqueo de la Peroxidasa Endógena.
- 3. Lavados en PBS.
- 4. Pretratamiento de los cortes con tripsina al0.1% en PBS 10 minutos.
- 5. Lavados en PBS (tampón fosfato salino o buffer fosfato salino).
- 6. Incubación en anticuerpo primario durante 48 horas en nevera.
- 7. Lavados en PBS.
- 8. Anticuerpo secundario 1 hora.
- 9. Lavados en PBS.
- 10. Anticuerpo terciario 1 hora.
- 11. Lavados en PBS.
- 12. Lavado en TRIS.
- 13. Revelado con DAB 5 minutos.
- 14. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- 15. Contratinción con Hematoxilina de Harris 30 segundos.
- 16. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- 17. Lavado en agua destilada.
- 18. Deshidratación y montaje en DPX.

## 4.3.3.2. Determinación inmunohistoquímica de Ki67

El antígeno Ki67 es una proteína nuclear que se expresa en todas las partes activas del ciclo celular pero está ausente en las células en reposo.

La técnica se empleó con la finalidad de identificar células en proliferación en la pared de las venas. El protocolo seguido fue el siguiente:

- 1. Desparafinado e hidratación de los cortes.
- 2. Bloqueo de la Peroxidasa Endógena.
- 3. Lavados en PBS TRITON (PBST).
- 4. Pretratamiento de los cortes con tripsina al0.1% en PBS 30 minutos.
- 5. Lavados en PBST.
- 6. Lavados en PBSTGAL 2 días en agitación fuerte.
- 7. Lavados en PBST.
- 8. Incubación en anticuerpo primario a 1/100 durante 24 horas a temperatura ambiente.
- 9. Lavados en PBST.

- 10. Anticuerpo secundario 1 hora.
- 11. Lavados en PBST.
- 12. Anticuerpo terciario 1 hora.
- 13. Lavados en PBST.
- 14. Lavado en TRIS.
- 15. Revelado con DAB 3 minutos.
- 16. Lavado en agua corriente durante minutos.
- 17. Contratinción con Hematoxilina de Harris 30 segundos.
- 18. Lavado en agua corriente durante minutos.
- 19. Lavado en agua destilada.
- 20. Deshidratación y montaje en DPX.

#### 4.3.3.3. Determinación inmunohistoquímica de VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por Vascular Endothelial Growth Factor) es una proteína implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis. Otras acciones que se le atribuyen son el estímulo sobre la migración de monocitos y macrófagos. Estudios *in vitro* han demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales, posee un efecto vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular, y su incremento puede estar relacionado con una situación de hipoxia del tejido, donde las células estimulan el proceso de angiogénesis para mejorar el aporte de oxígeno [Lim et al. 2012].

La determinación del factor se utilizó para el estudio de la presencia de angiogénesis en la pared del segmento venoso. El protocolo seguido para el procedimiento fue el siguiente:

- 1. Desparafinado e hidratación de los cortes.
- 2. Bloqueo de la Peroxidasa Endógena.
- 3. Lavados en PBS.
- 4. Pretratamiento de los cortes con calor en buffer citrato 10 minutos.
- 5. Lavados en PBS.
- 6. Incubación en anticuerpo primario a 1/100 durante 48 horas en nevera.
- 7. Lavados en PBS.
- 8. Anticuerpo secundario 1 hora.
- 9. Lavados en PBS.
- 10. Anticuerpo terciario 1 hora.
- 11. Lavados en PBS.
- 12. Lavado en TRIS.
- 13. Revelado con DAB 5 minutos.
- 14. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- 15. Contratinción con Hematoxilina de Harris 30 segundos.
- 16. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- 17. Lavado en agua destilada.
- 18. Deshidratación y montaje en DPX.

## 4.3.3.4. Determinación inmunohistoquímica de elastina

La elastina es una proteína polimérica que se encuentra en el tejido conjuntivo. Ultraestructuralmente, se considera un material predominantemente amorfo que puede cambiar su morfología con la edad y diferentes enfermedades. La acumulación anómala de tejido elástico en los vasos sanguíneos se haya en la hipertensión y en la arterioesclerosis.

El anticuerpo anti-elastina se une a la elastina insoluble,  $\alpha$  elastina, tropoelastina (elastina soluble no unida a otras proteínas) y fragmentos peptídicos producidos por la degradación proteolítica de la elastina insoluble.

En este estudio se utilizó la determinación del marcador con la finalidad de identificar la presencia de la proteína libre en la pared del segmento venoso. El protocolo seguido para el procedimiento fue el siguiente:

- 1. Desparafinado e hidratación de los cortes.
- 2. Bloqueo de la Peroxidasa Endógena.
- 3. Lavados en PBS.
- 4. Pretratamiento de los cortes con calor en buffer citrato 10 minutos.
- 5. Lavados en PBS.
- 6. Incubación en anticuerpo primario a 1/200 durante 24 horas en nevera.
- 7. Lavados en PBS.
- 8. Anticuerpo secundario 1 hora.
- 9. Lavados en PBS.
- 10. Anticuerpo terciario 1 hora.
- 11. Lavados en PBS.
- 12. Lavado en TRIS.
- 13. Revelado con DAB 5 minutos.
- 14. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- 15. Contratinción con Hematoxilina de Harris 30 segundos.
- 16. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- 17. Lavado en agua destilada.
- 18. Deshidratación y montaje en DPX.

# 4.4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DIGITAL

### 4.4.1. Selección de las muestras

Inicialmente se disponía de 94 segmentos (14 controles y 80 correspondientes a segmentos con insuficiencia venosa primaria). Muestras de cada segmento fueron teñidas con tricrómico de Masson y con la tinción de resorcina fuesina, anteriormente descritas.

#### Estudio del grosor de las capas

Tras un análisis exploratorio previo de los cristales obtenidos, se descartaron 19 de los segmentos iniciales (4 segmentos control y 15 segmentos con insuficiencia venosa primaria) por estar artefactados y no mostrar claramente los límites de las distintas capas de la pared, lo que dificultaba obtener medidas fiables. La figura 24 muestra un ejemplo de una muestra de un segmento descartado.



Figura 24. Muestra de vena safena artefactada teñida con tricrómico de Masson

Así, el estudio del grosor de las capas de la pared venosa contempló 75 muestras de la vena safena interna, procedentes del cayado, del muslo y de la pierna. En la tabla 5 se indica la distribución de las muestras según la procedencia y características hemodinámicas del segmento.

	Tipo de segmento			
Procedencia	Control	Competente	Incompetente	
Cayado	6	11	19	36
Muslo	1	15	4	20
Pierna	3	10	6	19
	10	36	29	75

 Tabla 5. Desglose de muestras para el estudio del grosor de las capas, según procedencia y tipo de segmento

#### Estudio de las componentes de fibra muscular y matriz extracelular

La exploración de las muestras teñidas con tricrómico de Masson mostró algunas tinciones con mal contraste, como la mostrada en la figura 25 donde predomina el color rojo a lo largo del perímetro de la pared y no permite distinguir sus componentes.



Figura 25. Tinción de tricrómico de Masson con contraste defectuoso

Algunas tinciones fueron repetidas y en la mayor parte de los casos se reprodujo el resultado, no pudiendo obtenerse una tinción satisfactoria.

Finalmente el estudio de las componentes de fibra muscular y matriz extracelular (MEC) abarcó 48 muestras, procedentes del cayado, del muslo y de la pierna, con el desglose indicado en la tabla 6.

	Tipo de segmento			
Procedencia	Control	Competente	Incompetente	
Cayado	3	4	15	22
Muslo	1	12	3	16
Pierna	2	6	2	10
	6	22	20	48

**Tabla 6.** Desglose de muestras para el estudio de la componente de fibramuscular y MEC, según procedencia y tipo de segmento

#### Estudio de la componente de fibras elásticas

Para el estudio de la componente de fibras elásticas se utilizó inicialmente la tinción de Van Gieson. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, con un fondo en la pared venosa de color naranja muy fuerte que no permitía contrastar correctamente las fibras elásticas existentes en la pared (ver figura 26).



Figura 26. Muestras con tinción de Van Gieson

Mejores resultados se obtuvieron con una modificación de la tinción de Van Gieson sin picrofucsina. En la tabla 7 se indica la distribución de muestras según la procedencia y tipo de segmento para este estudio.

	-			
	Tipo de segmento			
Procedencia	Control	Competente	Incompetente	
Cayado	6	11	19	36
Muslo	1	15	4	20
Pierna	2	10	6	18
	9	36	29	74

 Tabla 7. Desglose de muestras para el estudio de la componente de fibras elásticas, según procedencia y tipo de segmento

#### Estudio inmunohistoquímico

Para el estudio inmunohistoquímico se seleccionaron dos muestras de cada procedencia anatómica y tipo de segmento. Los anticuerpos utilizados en el estudio fueron anti-CD68, anti-VEGF, anti-Elastina y anti-Ki67. Los criterios de selección fueron que estuvieran bien formadas, con suficiente tejido disponible que hubiera sido incluida en los estudios histoquímicos anteriores.

### 4.4.2. Estudio microscópico y obtención de imágenes

El estudio microscópico y la obtención de imágenes digitales se realizó con un microscopio Leica Digital Microimaging Device 108. El microscopio proporciona herramientas que permiten medir distancias y superficies de una muestra, así como capturar imágenes digitales de la muestra analizada.

Se tomaron medidas de las siguientes variables:

- Grosor de la capa íntima, determinada por la zona entre la luz y la primera capa de lámina elástica interna o sus restos. En las muestras de segmentos

incompetentes, donde se observa una íntima más irregular, se consideraron dos grosores: el grosor de la zona más ancha, y el grosor de la zona más estrecha.

- Grosor de la capa media de la muestra.

En el estudio de los grosores de las capas de la pared venosa no se consideró la capa adventicia, por ser una capa difusa y no tener la seguridad de disponer de la misma en toda su extensión, debido a los daños producidos en el proceso de extracción. La muestra de la figura 27 es un ejemplo de este hecho.



Figura 27. Muestra de vena safena con adventicia artefactada

En cada capa se tomaron 3 medidas representativas del grosor de la misma de las que se calculó su media aritmética.

En el anexo 1 se detalla la información disponible de cada muestra. La unidad de medida para el grosor de las capas es el micrómetro  $(\mu m)$ .

Se capturaron y guardaron digitalmente imágenes de todas las muestras de las diferentes tinciones con un aumento de 4x. El tamaño de cada imagen es de 2048 x 1536 píxeles, con una resolución de 72 píxeles por pulgada. Las imágenes se almacenaron en formato jpeg con objeto de ser procesadas digitalmente posteriormente.

En algunos casos se capturaron imágenes con un aumento de 20x y 40x para la observación de detalles.

## 4.4.3. Procesamiento digital de las imágenes

Algunas de las características que se pretendían estudiar, como la variación de fibras musculares, matriz extracelular y fibras elásticas en las muestras de las venas, requieren de un método que permita su cuantificación para lo que se emplearon técnicas de procesamiento digital de imágenes.

De entre las herramientas disponibles en el mercado para el procesamiento digital de imágenes se utilizó *Matlab*, al ser una herramienta muy extendida, fácil de utilizar, con amplio soporte matemático, multitud de funciones ya desarrolladas y una amplia documentación [Cuevas et al. 2010]. Concretamente se utilizó MATLAB versión 7.4 (R2007a) que es de la que se dispone licencia corporativa en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

## 4.4.3.1. Cuantificación de fibras musculares y matriz extracelular

A partir de las tinciones con tricrómico de las muestras se identificaron y delimitaron las zonas de color representativas de fibras musculares y las zonas de color representativas de matriz extracelular, con objeto de cuantificar su extensión en píxeles.

Dado que la superficie de corte de cada vena es diferente es necesario normalizar la extensión de las componentes de cada muestra por la extensión de la sección de la vena, de forma similar a como se ha realizado en otros trabajos [Porto et al. 1995; Elsharawy et al. 2007], lo que se ha conseguido mediante el siguiente cociente:

De esta forma se obtiene una medida en forma de proporción, que permite comparar las distintas muestras entre sí.

Para la identificación de los componentes de interés se consideró la posibilidad de utilizar uno de los siguientes tres métodos de segmentación de imágenes: agrupamiento, deconvolución de color y cortes de color.

El método deconvolución de color está indicado en muestras histológicas con tinciones compuestas de varios colorantes, como el tricrómico de Masson que es el empleado en las muestras a analizar. La deconvolución de color permite calcular la contribución de cada uno de los colorantes empleados en la tinción (2 o 3 colorantes a lo sumo), para lo que es necesario especificar el color de cada uno de los colorantes empleados en su estado puro sobre las muestras (denominados *vectores de tinción*) [Ruifrok et al. 2001]. Dado que el color del colorante varía con el suministrador del mismo, las condiciones de su almacenaje y su método de aplicación, no se puede garantizar que los vectores de tinción sean válidos para todas las muestras de una misma tinción, y se requiera una redefinición de los mismos. Por otra parte, no es recomendado para analizar muestras que han sido ya procesadas, por la dificultad o imposibilidad de obtener el color exacto de los colorantes empleados en su tinción [Macenko et al. 2009].

La segmentación por cortes de color requiere delimitar el rango de colores que caracteriza a cada componente que se desea identificar, y que estos rangos sean disjuntos. Su delimitación es subjetiva, siendo susceptible de errores en su definición y de sufrir variaciones entre distintas muestras de una misma tinción (la figura 28 muestra 2 cortes distintos de nuestro estudio con distinto color).



Figura 28. Variación de color en dos cortes con tinción de tricrómico de Masson

El método de agrupamiento resulta más adecuado cuanto más diferenciado es el color de los componentes a identificar. Cuenta con la ventaja de ser un método automático, sin necesidad de realizar especificaciones de color previas y no limitado a 2 o 3 colores como la deconvolución de color.

Tras evaluar las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, el método escogido para realizar la segmentación fue el método de agrupamiento.

El proceso que se realiza con cada imagen consta de 2 fases:

• En una primera fase se delimitan los contornos interno y externo de la pared venosa que incluye todas las capas y define la zona de estudio, y cuya extensión corresponde al denominador de la expresión (4.1).

Para ello las imágenes en color se convirtieron a escala de grises, para posteriormente emplear el método de segmentación basado en valor umbral y obtener una imagen en blanco y negro, siguiendo la secuencia de pasos que se muestra en el diagrama de flujo en la figura 29. El valor idóneo del umbral depende de aspectos como la luz con la que se tomó la fotografía de la imagen, la existencia de sombras y de partículas de suciedad, etc., de manera que su valor se determinó individualmente para cada imagen.

Como valor umbral inicial se utilizó el proporcionado por la función *graythresh* de *Matlab* que implementa el algoritmo de Otsu. Este valor umbral es ajustado posteriormente de forma interactiva en función de la imagen binarizada resultante.

A continuación se eliminan defectos de la pared de la vena como pliegues, y también manchas, partículas de suciedad, restos de tejido, sangre, etc. de la luz del vaso y del exterior de la pared venosa.



Figura 29. Flujograma para la delimitación del área de la pared venosa

• En una fase posterior, a partir de la imagen de la tinción de tricrómico de la muestra se identificaron y delimitaron los componentes de la pared venosa mediante el algoritmo de agrupamiento *k-means*. Una vez delimitadas ambas zonas, se obtuvo la extensión, en píxeles, de cada componente que constituye el numerador de la expresión indicada en (4.1) para el cálculo de la proporción de dicho componente.

El algoritmo k-means ya se encuentra implementado en *Matlab* mediante una función propia llamada kmeans. Para su ejecución se necesita especificar a la función la siguiente información:

- La ubicación de los datos de entrada (nombre del fichero de la imagen).
- La cantidad de grupos de píxeles k que se pretenden obtener, cuyo valor se fijó en k=3 con la finalidad de agrupar los píxeles que corresponden a fibra muscular, los que corresponden a MEC y el resto (fondo de la imagen).
- La métrica utilizada para medir la similitud entre un píxel y un centroide, escogiéndose la distancia euclídea (expresión 1.1).

- La cantidad de repeticiones del algoritmo sobre los mismos datos de entrada, su valor se fijó en 3 repeticiones. La función devuelve la agrupación de píxeles más óptima de las 3 ejecuciones realizadas.
- La forma de elegir el valor inicial de los centroides, escogiéndose elección aleatoria.

La ejecución de la función devuelve el grupo (valor entre 1 y k) al que pertenece cada uno de los píxeles de la imagen original.

La secuencia de pasos se recoge en el flujograma mostrado en la figura 30.



Figura 30. Flujograma para la delimitación de fibras musculares y matriz extracelular mediante agrupamiento k-means

Las figuras 31 y 32 muestran el contenido de los scripts utilizados con el software Matlab para la delimitación del área de la pared y de las componentes de fibra muscular y MEC respectivamente, siguiendo la secuencia de pasos reflejada en las figuras 29 y 30.

```
% Cargar imagen de la muestra
Icolor = imread('archivo.jpg');
% Conversion imagen color a escala de grises
Igris = rgb2gray(Icolor);
% Valor umbral inicial mediante Otsu
umbral = graythresh(Igris);
% Modificar valor umbral hasta obtener un resultado satisfactorio
resp = 1;
while (resp~=0)
    % binarizar por el valor umbral
   Ibw = im2bw(Igris,umbral);
    % obtener negativo de la imagen
   Ibwneg = imcomplement(Ibw);
    % mostrar en pantalla la imagen resultante
    imshow(Ibwneg)
    resp = input('UMBRAL: Decrementar=1/Incrementar=2/Salir=0 ? ');
    if (resp==1)
       umbral = umbral - 0.005;
    end;
    if (resp==2)
        umbral = umbral + 0.005;
    end:
end;
% Identificar pliegues en la pared venosa
pliegues = im2bw(Igris,40/255);
% Eliminar pliegues de la imagen de la pared venosa
Ibwneg = Ibwneg.*pliegues;
% Limpiar fondo imagen
% componentes conectados (conectividad-8) de tamaño max. 200 píxeles
Ibwclean = bwareaopen(Ibwneg,200,8);
Ibwclean = imcomplement(Ibwclean);
% la matriz de la imagen debe ser binaria
Ibwclean = logical(Ibwclean);
% Eliminar objetos seleccionados interactivamente
% pulsar ENTER para omitir este paso
% doble click para finalizar la selección de objetos
vena = imfill(Ibwclean);
vena = imcomplement(vena);
% Area pared venosa (píxeles)
sum(sum(vena))
% Guardar imagen área pared venosa
imwrite(vena, 'MuestraArea.jpg', 'Quality', 100);
```

Figura 31. Script de *Matlab* para la delimitación del contorno interior y exterior de la pared venosa

```
% Cargar imagen de la muestra
Icolor = imread('archivo.jpg');
% Cargar imagen del área de la muestra
IArea = imread('MuestraArea.jpg');
% Filtrar imagen de la muestra por imagen del área
mask = repmat(IArea, [1 1 3]);
Icolor(~mask) = 255;
% Transformar matriz de la imagen en vector largo
ab = double(Icolor(:,:,:));
nrows = size(ab,1);
ncols = size(ab,2);
ab = reshape(ab,nrows*ncols,3);
% K-means para agrupar en 3 clusters
nColors = 3;
clus id =
kmeans(ab,nColors,'distance','sqEuclidean','Replicates',3,'start','uniform');
pixel_label = reshape(clus_id,nrows,ncols);
% Crea 3 copias de la imagen, una para cada cluster
cluster = cell(1,3);
rgb_label = repmat(pixel_label,[1 1 3]);
for k = 1:nColors
    color = Icolor;
    % los pixeles no pertenecientes al cluster k se ponen a negro
    color(rgb_label ~= k) = 0;
    cluster{k} = color;
end;
% Conversion imagenes color a escala de grises
cl1 = rgb2gray(cluster{1});
cl2 = rgb2gray(cluster{2});
cl3 = rgb2gray(cluster{3});
% Binarizar imagenes de los clusters
cl1t = im2bw(cl1,15/255);
cl2t = im2bw(cl2,15/255);
cl3t = im2bw(cl3,15/255);
% Mostrar imágenes de los clusters
imshow(cl1t)
imshow(cl2t)
imshow(cl3t)
% Area pared venosa (píxeles)
a = sum(sum(IArea));
% Area imágenes clusters (píxeles)
a1 = sum(sum(cl1t));
a2 = sum(sum(cl2t));
a3 = sum(sum(cl3t));
% Guardar imagenes clusters en archivos individuales
imwrite(cl1t,'clt1.jpg','Quality',100);
imwrite(cl2t,'clt2.jpg','Quality',100);
imwrite(cl3t,'clt3.jpg','Quality',100);
% Almacenar resultados numericos en archivo texto
fd=fopen('fmcol.txt','wt');
fprintf(fd, 'Area pared: %d - cl1: %d - cl2: %d - cl3: %d',a,a1,a2,a3);
fclose(fd);
```

Figura 32. Script de Matlab para la delimitación de las componentes de fibra muscular y MEC

La figura 33 muestra el resultado de las fases indicadas. La imagen en blanco y negro resultante de la fase 1 delimita el área de la pared. Las imágenes en blanco y negro situadas a la derecha de la figura muestran las zonas identificadas correspondientes a fibras musculares y matriz extracelular (imagen superior e inferior, respectivamente).



Figura 33. Resultado de las fases de procesamiento de la imagen para la cuantificación de fibra muscular y matriz extracelular

En la figura 33 se puede observar que de la imagen original de la pared venosa se eliminan aquellas zonas que se corresponden con pliegues, artefactos, sangre, etc. con objeto de obtener medidas lo más precisas posibles. En la figura 34 se observa con mayor detalle los defectos eliminados de la imagen original de la muestra.

Las mediciones obtenidas, mediante el proceso descrito, de la extensión en píxeles de la superficie de la pared venosa y de las componentes de fibra muscular y MEC de la pared venosa se indican en el anexo 2.



Figura 34. Exclusión de defectos de la imagen original

## 4.4.3.2. Cuantificación de fibras elásticas

Para la cuantificación de las fibras elásticas se utilizaron las muestras teñidas con resorcina sin picrofucsina. Al igual que se hizo en la cuantificación de fibras musculares y MEC, la medida de la extensión de fibras elásticas se normalizó dividiéndola por la extensión de la sección de la vena, obteniéndose una medida de proporción.

El proceso que se realizó con cada imagen consta de 2 fases:

- En una primera fase se delimitan los contornos interno y externo de la pared venosa que define la zona de estudio al igual que se realizó para la cuantificación de las fibras musculares y MEC, y cuya extensión en píxeles corresponde al denominador de la expresión (4.1). La secuencia de pasos realizados se corresponde a los ya indicados en el flujograma en la figura 29.
- A continuación, a partir de la imagen de la tinción de resorcina sin picrofucsina de la muestra se identifican y delimitan las fibras elásticas de la pared venosa, mediante segmentación por el método del valor umbral, tratando de localizar el rango de tonalidades de gris que representan adecuadamente las fibras elásticas existentes. Como valor umbral inicial se utilizó el proporcionado por la función graythresh de Matlab que implementa el algoritmo de Otsu. Su extensión en píxeles constituye el numerador de la expresión indicada en (4.1).

La tinción de resorcina sin picrofucsina realizada colorea las fibras elásticas de un color oscuro, cuya tonalidad depende del grosor de las fibras, observándose en la capa adventicia una tonalidad más oscura que en el resto de capas. La imagen de la figura 35 es un ejemplo de este hecho, donde las fibras de la lámina elástica interna tienen una tonalidad más clara que las fibras situadas en la capa adventicia. En estas condiciones, si se escoge como patrón de fibras elásticas la tonalidad de gris

existente en la capa adventicia no se detectarían las fibras del resto de capas por tener una tonalidad de gris más clara. Por el contrario, escoger la tonalidad de la lámina elástica interna provoca la detección de multitud de objetos que no son necesariamente fibras elásticas, impidiendo una discriminación clara de las fibras elásticas de la imagen.

La forma de resolver este problema ha sido cuantificar de forma independiente las fibras elásticas en la capa adventicia y en la capa íntima/media. Para ello se ha hecho uso del software Photoshop para eliminar de la imagen la capa de la pared venosa que no se deseaba cuantificar.



Figura 35. Diferentes tonalidades de tinción de las fibras elásticas con la tinción de resorcina sin picrofucsina

Se analizaron las componentes R, G y B de diferentes imágenes de muestras observándose que en la mayoría de casos la componente R o G permite discriminar mejor las fibras elásticas. De manera que en lugar de trabajar con la imagen en color, el análisis se realizó sobre una de las componentes de color indicadas. En la figura 36 se muestra, a modo de ejemplo, las componentes R, G y B de una de las muestras de pared venosa.

La secuencia de pasos seguida tanto en la capa adventicia como en la capa íntima/media se indica en el flujograma mostrado en la figura 37. La figura 38 muestra el contenido del script utilizado con el software *Matlab* para la delimitación de la componente de fibras elásticas de la pared venosa.



Figura 36. Componentes R, G y B de una imagen con tinción de resorcina sin picrofucsina



Figura 37. Flujograma para la delimitación de fibras elásticas

```
% Cargar imagen de la muestra
Icolor = imread('archivo.jpg');
% Extraer componente color G de la imagen
IG = Icolor(:,:,2);
% Cargar imagen del área de la muestra
IArea = imread('MuestraArea.jpg');
% Filtrar imagen de la muestra por imagen del área
IG(\sim IArea) = 255;
% Valor umbral inicial mediante Otsu
umbral = graythresh(IG);
% Modificar valor umbral hasta obtener un resultado satisfactorio
resp = 1;
while (resp~=0)
    % binarizar por el valor umbral
    Ibw = im2bw(IG,umbral);
    % obtener negativo de la imagen
    Ibwneg = imcomplement(Ibw);
    % mostrar en pantalla la imagen resultante
    imshow(Ibwneg)
    resp = input('UMBRAL: Decrementar=1/Incrementar=2/Salir=0 ? ');
    if (resp==1)
        umbral = umbral - 0.005;
    end;
    if (resp==2)
        umbral = umbral + 0.005;
    end;
end:
% Area pared venosa (píxeles)
a = sum(sum(IArea));
% Area fibras elasticas (píxeles)
aFE = sum(sum(Ibwneg));
% Guardar imagen fibras elasticas
imwrite(Ibwneg, 'FE.jpg', 'Quality', 100);
% Almacenar resultados numericos en archivo texto
fd=fopen('FE.txt','at');
fprintf(fd,'\r\n umbral: %f - Area FE: %d - Area pared: %d',umbral*255,aFE,a);
fclose(fd);
```

Figura 38. Script de Matlab para la delimitación de la componente de fibra elástica

La figura 39 muestra el resultado de las fases indicadas. Las imágenes en blanco y negro situadas en la parte superior corresponden a las capas íntima y media, mientras que las situadas en la parte inferior corresponden a la capa adventicia.

Las mediciones obtenidas de la extensión en píxeles de las fibras elásticas para cada muestra mediante el proceso descrito se indican en el anexo 3.



Figura 39. Resultado de las fases de procesamiento de la imagen para la cuantificación de fibras elásticas

### 4.4.3.3. Cuantificación de marcadores inmunohistoquímicos

El color es la característica más importantes de las tinciones inmunohistoquímicas, siendo clave para la identificación de los antígenos de interés. Los métodos de segmentación más habituales en la literatura especializada son la deconvolución de color y los cortes de color.

Se descartó la deconvolución de color al observar bastante variabilidad en el color de las muestras a estudiar, y al ser imposible obtener el color exacto de los colorantes empleados en la tinción. La técnica de segmentación por cortes de color resulta más sencilla y su utilización para cuantificación se encuentra documentada haciendo uso de software como Photoshop [Tolivia et al. 2006] o ImageJ [Mezei et al. 2012].

Para la cuantificación mediante segmentación por cortes de color se adoptó como color prototipo el correspondiente a la reacción positiva anticuerpo-antígeno en cada una de las tinciones inmunohistoquímicas de las que se dispone. La técnica fue implementada en *Matlab* con objeto de facilitar la elección del color patrón a nivel de píxel, y poder evaluar los resultados con diferentes modos de color y diferentes métricas de distancia.

Identificadas las zonas de interés se cuantificó su extensión en píxeles, para posteriormente dividirlo por la extensión de la sección de la vena, obteniéndose una medida de proporción.

El proceso que se realiza en cada tinción se inicia con un análisis detallado de la serie de imágenes disponibles con objeto de identificar el color característico de las áreas que se pretenden identificar, y que constituirá el color prototipo para esa tinción.

A continuación en cada imagen de dicha tinción se desarrollan las siguientes 2 tareas:

- Se delimitan los contornos interno y externo de la pared venosa que definen la zona de estudio, y cuya extensión en píxeles corresponde al denominador de la expresión (4.1), siguiendo la secuencia de pasos indicados en la figura 29.
- A partir de la imagen en color de la tinción de inmunohistoquímica de la muestra se identifican los píxeles con un color similar al prototipo. Su extensión en píxeles constituye el numerador de la expresión indicada en (4.1).

El proceso de segmentación busca los píxeles de la imagen cuyo color se encuentra incluido en un rango de colores centrado en el color prototipo de la tinción. El rango de colores abarca a todos aquellos colores que se encuentren a menos de una distancia dada (*margen*) del color prototipo, de esta forma se posibilita la identificación de píxeles con un color que sea una ligera variación del color prototipo, como consecuencia de la variabilidad de reacciones bioquímicas y factores que afectan al proceso de tinción. El valor del margen es configurable pudiendo adaptarse a las particularidades de cada tinción.

Por su correlación con la percepción visual humana se escogió trabajar con el estándar CIELab, de modo que las imágenes se convirtieron del modo de color RGB al modo de color L\*a\*b\* mediante una función de *Matlab* denominada RGB2Lab.

La distancia entre píxeles se calculó mediante la distancia euclídea entre las componentes de color de cada uno de los píxeles, utilizando la expresión (1.1) particularizada al modo de color  $L^*a^*b^*$ , de modo que la distancia o similitud entre un píxel de componentes ( $L^*,a^*,b^*$ ) y el color prototipo de componentes ( $L^*,a^*,b^*$ ) sería:

similitud de color = 
$$\sqrt{(L * - L *)^2 + (a * - a *)^2 + (b * - b *)^2}$$

Así, en esta fase se tiene como entrada la imagen a analizar, el color prototipo y un valor del margen, y tras realizar la secuencia de pasos indicados en el diagrama de flujo en la figura 40 devuelve una imagen en blanco y negro con los píxeles identificados resaltados en color blanco.



Figura 40. Flujograma para la delimitación de los marcadores inmunohistoquímicos

La figura 41 muestra el contenido del script utilizado con el software *Matlab* para la delimitación de los marcadores inmunohistoquímicos.

En la figura 42 se muestra, a título ilustrativo, el resultado de las fases de delimitación del área y de identificación de los marcadores para una tinción VEGF. En la parte inferior de la figura se muestra la zona segmentada superpuesta en color verde sobre la imagen original.

```
% Cargar imagen de la muestra
Icolor = imread('archivo.jpg');
% Cargar imagen del área de la muestra
IArea = imread('MuestraArea.jpg');
% Filtrar imagen de la muestra por imagen del área
Icolor(~IArea) = 255;
% Cambiar modo de color de RGB a L*a*b*
[L,a,b] = RGB2Lab(Icolor);
% Leer color patrón
ref = cell(1,3);
ref(1) = input('Patrón color: Componente L* ? ');
ref(2) = input('Patrón color: Componente a* ? ');
ref(3) = input('Patrón color: Componente b* ? ');
% Leer valor margen
margen = input('Valor margen ? ');
% Modificar margen hasta obtener un resultado satisfactorio
resp = 1;
while (resp~=0)
    % Calcular distancia con color patrón
    distancia = zeros(size(L));
    distancia = ((L-ref(1)).^2 + (a-ref(2)).^2 + (b-ref(3)).^2).^0.5;
    tmp = (distancia < margen);</pre>
    % mostrar en pantalla la imagen resultante
    imshow(tmp)
    resp = input('MARGEN: Decrementar=1/Incrementar=2/Salir=0 ? ');
    if (resp==1)
       margen = margen - 0.5;
    end:
    if (resp==2)
        margen = margen + 0.5;
    end;
end;
% Area pared venosa (píxeles)
a = sum(sum(IArea));
% Area marcadores inmunos (píxeles)
aInm = sum(sum(tmp));
% Guardar imagen fibras elasticas
imwrite(tmp,'inmunos.jpg','Quality',100);
% Almacenar resultados numericos en archivo texto
fd=fopen('inmunos.txt','at');
fprintf(fd,'\r\n Lab(%f,%f,%f) - margen:%f - AreaInm:%d - Area:%d', ref(1),
ref(2), ref(3),margen,aInm,a);
fclose(fd);
```

Figura 41. Script de Matlab para la delimitación de marcadores inmunohistoquímicos



Figura 42. Resultado de las fases de procesamiento de la imagen para la cuantificación de marcadores inmunohistoquímicos

# 4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico R versión 3.0.2, al que se le instalaron librerías adicionales con funcionalidades específicas que no se proporcionan en la distribución base. Las librerías adicionales utilizadas fueron:

- *psych*, contiene funciones que proporcionan estadísticos básicos (media, mediana, varianza, desviación estándar, mínimo, máximo, rango, asimetría,

error estándar, etc.) tanto a nivel de grupo como subgrupos agrupados según los valores de un determinado atributo.

- *ltm*, incluye la función *biserial.cor* para el cálculo de la correlación biserial puntual.
- *ggplot2*, paquete gráfico para la generación de las gráficas de barras, boxplots, gráficas de líneas, etc. que proporciona mayor funcionalidad y flexibilidad que los gráficos de la distribución base.
- *gridExtra*, que permite mostrar simultáneamente varias gráficas generadas con ggplot2 con la configuración deseada.
- reshape, transforma los datos que tienen formato de tabla ancha (cada línea de la tabla contiene todos los atributos) en un formato de tabla larga (cada línea de la tabla contiene un único atributo del dato). La necesidad de esta librería viene dada porque las gráficas utilizadas de ggplot2 exigen que los datos a representar estén en formato de tabla larga.

Inicialmente se realizó un análisis estadístico descriptivo para presentar la información gráfica y numérica disponible a nivel muestral.

A nivel gráfico se utilizaron boxplots por su facilidad de representar en un solo diagrama los principales parámetros estadísticos de un grupo de datos (mínimo, máximo, mediana, media, cuartiles, forma de la distribución). Su uso permite, además, localizar valores atípicos empleando el rango intercuartílico (IQR), de forma que aquellos valores situados fuera del intervalo

$$[Q_1 - 1.5 \cdot IQR, Q_3 + 1.5 \cdot IQR] \tag{4.2}$$

deberían merecer un estudio detallado debido a que pueden ser considerados valores atípicos.

Simultáneamente con la descripción gráfica se detallan numéricamente las principales medidas descriptivas de los parámetros estudiados, contemplando medidas de centralización como media, mediana y cuartiles, medidas de dispersión como rango y desviación estándar, y medidas de la forma de la distribución muestral como el grado de asimetría (*skew*). Todos estos valores se proporcionan desagregados con el nivel de detalle requerido en cada caso.

A continuación, en la figura 43 se muestra el contenido del script utilizado con el programa estadístico R para la generación de los subgrupos de muestras, la búsqueda de valores atípicos y la obtención de los datos estadísticos descriptivos de las muestras a nivel de subgrupo y a nivel global.

```
# Carga de los datos
venas = read.table("archivo.txt",header=T)
# Cantidad de muestras y de parámetros disponibles
dim(venas)
# Generacion subgrupos (cayado.control, cayado.comp, cayado.incomp, etc.)
subgrupo1 = venas[condicion1 & condicion2 & ...,]
subgrupo2 = venas[condicion1 & condicion2 & ...,]
# Formación 3 grupos de muestras (control, competente, incompetente)
grupo1 = rbind(subgrupo1,subgrupo2,subgrupo3)
grupo2 = rbind(subgrupo4,subgrupo5,subgrupo6)
grupo3 = rbind(subgrupo7,subgrupo8,subgrupo9)
# Carga librerias R necesarias
library(psych)
# Medidas descriptivas de un grupo
describeBy(grupo1[,c("Intima","Media")])
# Medidas descriptivas de los subgrupos que forman el grupo
describeBy(grupo1[,c("Intima", "Media")],group=grupo1$Procedencia)
# Identificación de valores atípicos
bxp1 = boxplot(subgrupo1[,c("Intima", "Media")])
bxp1$stats
bxp2 = boxplot(subgrupo2[,c("Intima", "Media")])
bxp2$stats
```

Figura 43. Script de R para la obtención de los estadísticos descriptivos de las muestras

Para el análisis estadístico inferencial se hizo uso de las técnicas de remuestreo, debido a que el pequeño tamaño de las muestras de datos hacen difícil verificar el cumplimiento de los requisitos de las técnicas estadísticas tradicionales.

Dentro de las técnicas de remuestreo se emplearon los *test de permutación* para realizar las pruebas de significación estadística para el contraste de hipótesis y el *bootstrapping* para la obtención del intervalo de confianza de un parámetro estadístico.

#### Test de permutación

Mediante los test de permutación se evaluó el nivel de significación estadística de:

- La diferencia de medias entre 2 grupos de datos independientes. El estadístico de interés es la diferencia de las medias aritméticas de ambos grupos, siendo la hipótesis nula que la diferencia de medias es cero.
- La diferencia de medias entre más de 2 grupos de datos independientes. Se utilizó un estadístico equivalente al estadístico F, pero que resulta más sencillo
de calcular y por lo tanto en ejecuciones del test de permutación más rápidas y eficientes [Butar 2007].

• La diferencia de medias entre grupos de datos pareados. La hipótesis nula es que no hay diferencias entre las medias de ambos grupos, o lo que es lo mismo, ambos grupos tienen el mismo valor medio (en base a que la media de las diferencias es igual a la diferencia de las medias). El test se implementó calculando inicialmente el valor de las diferencias entre los datos pareados, asignando de forma aleatoria el signo positivo o negativo a cada una de las diferencias, generando todas las posibles combinaciones [Hesterberg et al. 2003].

La ejecución de los test de permutación sobre datos independientes contemplaron 10.000.000 de remuestreos sobre la muestra original de los datos, lo que implica una resolución máxima para el valor de p de 10<sup>-7</sup>. En el caso de datos pareados, el test contempló todas las posibles combinaciones de signos.

El nivel de significación estadística se estableció en  $\alpha = 0.05$ . En la figura 44 se indican los algoritmos de los scripts utilizados con el software estadístico R para llevar a cabo los test de permutación antes indicados.

## Bootstrapping

Para la obtención de la distribución muestral bootstrap se realizaron 10.000.000 de remuestreos sobre la muestra original de los datos. Para la obtención de los límites del intervalo de confianza de un estadístico a partir de la distribución bootstrap, se utilizó el método BCa.

El nivel de confianza para los intervalos de confianza se estableció en el 95%. En la figura 45 se indica el algoritmo del script utilizado con el software estadístico R para la obtención del intervalo de confianza.

## Correlación

Se estudió la *relación lineal* entre los parámetros medidos de las muestras venosas, y la edad y sexo de los sujetos. El tipo de dato de las variables edad y sexo es cuantitativo y dicotómico respectivamente, de manera que el análisis de correlación con cada una de las variables exige un tratamiento estadístico diferente.

Para el estudio de la relación lineal con la edad de los sujetos se utiliza el coeficiente de correlación de Pearson  $\rho$ . Dado que este coeficiente es muy sensible a los valores atípicos existentes en los datos, se identificaron inicialmente los posibles valores atípicos mediante la regla indicada en la expresión (4.2). Los valores atípicos identificados fueron eliminados del conjunto de datos.

Los test de significación del coeficiente de Pearson se implementaron mediante un test de permutación al tener mejor rendimiento que otros métodos paramétricos y no paramétricos ante muestras de datos de tamaño pequeño [Bishara et al. 2012]. La hipótesis nula es que ambas variables (el parámetro medido y la edad) son independientes, no tienen relación lineal ( $\rho$ =0).

Para evaluar la relación lineal con el sexo de los sujeto se utilizó el coeficiente de correlación biserial puntual  $r_{bp}$ , calculado mediante la función biserial.cor disponible en el paquete *ltm* del programa estadístico R. Al igual que se indicó para el coeficiente de Pearson es muy sensible a los valores atípicos existentes en los datos, de manera que se identificaron inicialmente los posibles valores atípicos para descartarlos del cálculo.

Para evaluar la significación estadística de la relación existente con el sexo de los sujetos se realizaron adaptaciones al procedimiento empleado en el caso anterior de dos variables cuantitativas. El estadístico de estudio es el coeficiente de correlación biserial puntual  $r_{bp}$ , y el test de significación se ha implementado mediante un contraste de hipótesis cuya hipótesis nula es que las medias de los dos grupos de valores de la variable dicotómica son iguales. La aceptación de la hipótesis nula implica que ambos grupos de datos tienen la misma media, y por lo tanto no existe asociación lineal entre la variable cuantitativa y el sexo del sujeto.

En el anexo 4 se recoge los datos disponibles para el estudio de la existencia de asociación mutua con la edad y el sexo de los sujetos. Y en la figura 46 se indica el contenido del script utilizado con el software estadístico R para el cálculo del coeficiente de correlación y su grado de significación estadística.

```
# Comparación de medias entre 2 grupos independientes
# Suponer H_0 cierta, iqualdad de medias de ambos grupos (grupo1 y grupo2).
# Combinar las muestras en un único conjunto
poblacion = rbind(grupo1,grupo2)
# Diferencia observada entre las medias de los grupos
diff.obs = mean(grupo1) - mean(grupo2)
# Cantidad de remuestreos
num_permuta = 10000000
# Veces que la diferencia entre los remuestreos es igual o mayor que la
# diferencia observada (test de 1 cola)
exitos = 0
# Fijar semilla para garantizar la reproducibilidad de la prueba
set.seed(1234)
for (i in 1:num_permuta) {
        # Muestreo sin reemplazo del conjunto total de muestras
        grupo1.random = sample(poblacion,nrow(grupo1),replace=FALSE)
        grupo2.random = setdiff(poblacion,grupo1.random)
        # Calcular diferencia entre remuestreos y comparar con la observada
        if ((mean(grupo1.random) - mean(grupo2.random)) >= diff.obs) {
                 exitos = éxitos + 1
```

```
}
}
# Los resultados derivan de un número finito de permutaciones. El valor p es la
# proporción de éxitos calculada mediante (exitos+1)/(num_permuta+1)
pValue = (exitos + 1)/(num_permuta + 1)
# Comparación de medias entre más de 2 grupos independientes
# Suponer H_0 cierta, no hay diferencia entre las medias de los grupos.
# Combinar las muestras en un único conjunto
poblacion = rbind(grupo[1],grupo[2], grupo[3])
# Configurar parámetros del test
narupos = 3
N = length(población)
num_permuta = 10000000
# Calcular el estadístico en la muestra
SSX.obs = 0
for (i in 1:ngrupos) {
        ng[i] = length(grupo[i])
         SSX.obs = SSX.obs + ng[i]*(mean(grupo[i]))^2
3
C = sum((población - mean(población))^2)
F.obs = (SSX.obs/(ngrupos - 1))/((C - SSX.obs)/(N - ngrupos))
# Veces que el estadístico entre los remuestreos es igual o mayor que el
# estadístico observado (test de 1 cola)
F.exitos = 0
# Fijar semilla para garantizar la reproducibilidad de la prueba
set.seed(1234)
for (i in 1:num_permuta) {
        mezcla = población
         SSX.pr = 0
         for (j in 1:ngrupos) {
                  # Remuestreo sin reemplazo de la poblacion
                  grupo.random = sample(mezcla,ng[j])
                  mezcla = setdiff(mezcla,grupo.random)
                  SSX.pr = SSX.pr + ng[j]*((mean(grupo.random))^2)
         }
         # Estadistico F de las muestras extraidas
         F.prm = (SSX.pr/(ngrupos - 1))/((C - SSX.pr)/(N - ngrupos))
         # Comparar con la observada
         if (F.prm >= F.obs) {
                  F.exitos = F.exitos + 1
         }
}
# El valor p es la proporción de éxitos como (exitos+1)/(num_permuta+1)
pValue = (F.exitos + 1)/(num_permuta + 1)
```

Aplicación del análisis digital de imágenes al estudio de la pared de venas procedentes de pacientes con insuficiencia venosa

```
# Comparación de medias entre 2 grupos de datos pareados
# Suponer H₀ cierta, igualdad de medias de ambos grupos (grupo1, grupo2)
# Los datos pareados están en la misma posición en grupo1 y grupo2
diff.par.obs = grupo1 - grupo2
# Cantidad de diferencias de valores pareados
n = length(diff.par.obs)
# Media de las diferencias observadas entre los valores pareados
mean.diff.par.obs = mean(diff.par.obs)
# Generar todas las combinaciones distintas de "n" elementos (+1 y -1)
elementos = as.data.frame(matrix(rep(c(-1,1),n),nr=2))
combinaciones = as.matrix(expand.grid(elementos))
# Asignar las diferencias observadas de los valores pareados a las
# distintas combinaciones, y calcular la suma de cada combinación
all.comb = combinaciones %*% abs(diff.par.obs)
# Calcular la media de cada combinación de diferencias
all.means = all.comb/n
# Veces que la media de las diferencias es tan extrema o mas que la diferencia
# observada (test de 2 colas)
above = sum(all.means >= abs(mean.diff.par.obs))
below = sum(all.means <= (abs(mean.diff.par.obs)*(-1)))</pre>
# Calcular valor p como la proporción de veces entre todas las combinaciones
(above + below)/nrow(combinaciones)
```

Figura 44. Scripts de R para la ejecución de los test de permutación

```
# Termino acelerador
jk.mean = sapply(1:length(cayado),function(x){
     jk.data = cayado[-x]
     return(mean(jk.data))
})
a = sum((ValMean1-jk.mean)^3)/(6*sum((ValMean1-jk.mean)^2)^(3/2))
# Percentiles corregidos del IC
q.low = pnorm(z0+(z0+qnorm(0.025))/(1-a*(z0+qnorm(0.025))))
q.upp = pnorm(z0+(z0+qnorm(0.975))/(1-a*(z0+qnorm(0.975))))
# Obtencion del IC
quantile(bootMean,c(q.low,q.upp))
```

Figura 45. Script de R para la obtención de los IC mediante bootstrapping

```
# Suponer H_0 cierta, las dos variables (var1 y var2) son independientes.
# Calcular el coeficiente de correlacion entre los atributos observados
rho.obs <- cor(var1,var2)</pre>
# Cantidad de remuestreos
num_permuta = 10000000
# Veces que el coeficiente de correlacion de los remuestreos es igual o mayor
# que el coeficiente de correlacion observado, o igual o menor que el valor
# negativo del coeficiente de correlacion observado (test de 2 colas)
cnt = 0
# Fijar semilla para garantizar la reproducibilidad de la prueba
set.seed(1234)
for (i in 1:num_permuta) {
         # Muestreo sin reemplazo los datos de las variables
         var1.random = sample(var1,length(var1),replace=FALSE)
         var2.random = sample(var2,length(var2),replace=FALSE)
         # Coeficiente correlacion de los remuestreos de las variables
         rho.random = cor(var1.random,var2.random)
         # Comparar el coeficiente de correlacion de los remuestreos con el
         # observado
         if (abs(rho.random) >= abs(rho.obs)) {
                   cnt = cnt + 1
         }
}
# El valor p es la proporción de veces que la correlación de los remuestreos
# supera la correlación observada, considerando test de 2 colas
pValue = (cnt + 1)/(num_permuta + 1)
```

Figura 46. Script de R para el cálculo de la correlación