5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El análisis de la pared venosa de las muestras ha consistido en:

1. Medición y estudio del grosor de las capas íntima y media
2. Cuantificación y estudio de la proporción de fibras musculares, matriz extracelular y fibras elásticas

todo ello realizando las comparaciones entre los diferentes grupos en función de la procedencia anatómica o características hemodinámicas de las muestras.

5.1.1. Análisis del grosor de las capas de la pared venosa

La variable cuantitativa que se tuvo en consideración fue el grosor de las capas íntima y media, cuyos valores medidos se encuentran recogidos en el anexo 1.

Se distinguen separadamente los grupos de muestras control, muestras pertenecientes a segmentos competentes y muestras pertenecientes a segmentos incompetentes, estos dos últimos segmentos obtenidos de pacientes con insuficiencia venosa confirmada. La procedencia anatómica del segmento permite, a su vez, la formación de tres subgrupos en cada grupo de muestras: 1) subgrupo procedente del cayado, 2) subgrupo procedente del muslo y 3) subgrupo procedente de la pierna.

Los parámetros estadísticos corresponden con los datos desagregados en función de la procedencia, así como con los datos agregados a nivel global.

5.1.1.1. Muestras control

La tabla 8 recoge numéricamente las principales medidas descriptivas del grosor de las capas íntima y media del grupo de las muestras control en función de la procedencia anatómica y la figura 47 muestra la representación gráfica. En cada boxplot se indica el valor medio de los datos mediante un círculo.

Tabla 8. Medidas descriptivas del grosor de las capas de las muestras control, desagregadas por procedencia anatómica y valores globales

Grosor (μm)	Capa							
	Íntima				Media			
	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*
Media aritmética	154.0	113.7	141.1	146.1	403.4	382.9	457.7	417.7
Desviación estándar	27.5	-	22.32	26.4	49.75	-	49.09	52.09
Mediana	153.4	113.7	131.6	139.4	403.5	382.9	478.3	410.6
Q_1	126.9	-	128.3	125.1	371.3	-	440.0	382.9
Q_3	176.3	-	149.1	166.6	423.5	-	485.7	478.3
Valor mínimo	122.0	113.7	125.1	113.7	337.5	382.9	401.6	337.5
Valor máximo	192.0	113.7	166.6	192.0	481.4	382.9	493.1	493.1
Rango	69.98	-	41.51	78.26	143.92	-	91.48	155.63
Asimetría	0.11	-	0.35	0.37	0.22	-	-0.35	0.16

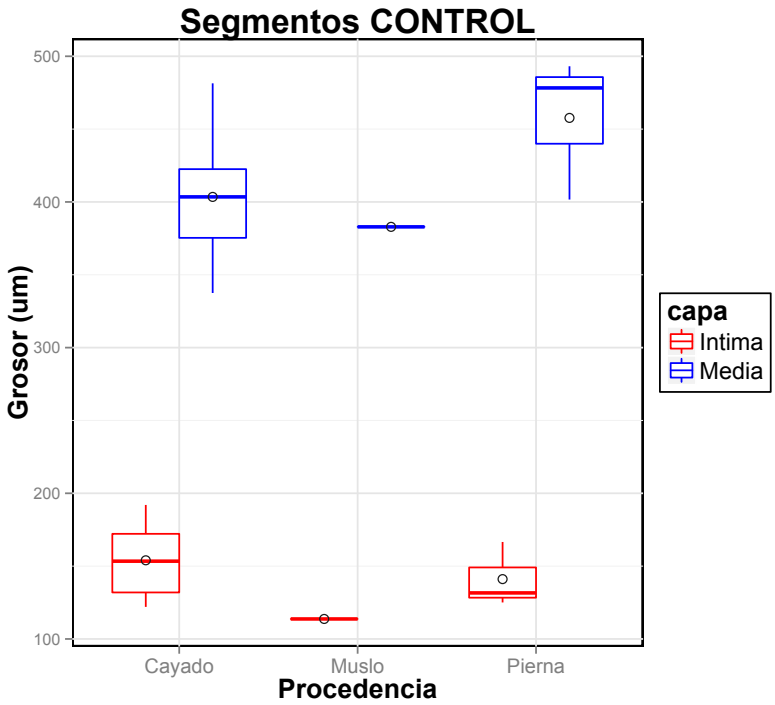

Figura 47. Distribución del grosor de las capas en las muestras control, por capa y procedencia anatómica

Dado el bajo número de muestras procedentes de sujetos controles (ver tabla 5) no resulta correcto aventurar ningún tipo de inferencia sobre esta subpoblación.

5.1.1.2. Muestras de segmentos competentes procedentes de sujetos con insuficiencia venosa

En la tabla 9 se indica las principales medidas descriptivas del grosor de la capa íntima y media del grupo de muestras de segmentos competentes obtenidas de pacientes con insuficiencia venosa, resultados representados gráficamente en la figura 48.

Tabla 9. Medidas descriptivas del grosor de las capas de las muestras de segmentos competentes, desagregadas por procedencia anatómica y valores globales

Grosor (μm)	Capa							
	Íntima				Media			
	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*
Media aritmética	224.3	203.8	193.3	207.1	524.1	512.7	442.6	496.7
Desviación estándar	91.78	80.3	87.96	84.42	139.17	117.4	130.87	128.98
Mediana	220.3	177.6	168.2	181.8	496.7	480.0	400.6	478.7
Q_1	156.7	147.7	125.6	136.9	422.6	431.0	333.4	397.2
Q_3	263.4	260.0	231.1	263.4	600.8	585.8	557.6	600.8
Valor mínimo	103.7	108.9	108.3	103.7	361.6	357.5	280.0	280.0
Valor máximo	396.7	392.8	363.8	396.7	791.9	751.5	647.9	791.9
Rango	293.0	284	255.5	293.0	430.3	394	367.9	511.9
Asimetría	0.47	0.88	0.72	0.75	0.62	0.6	0.38	0.52

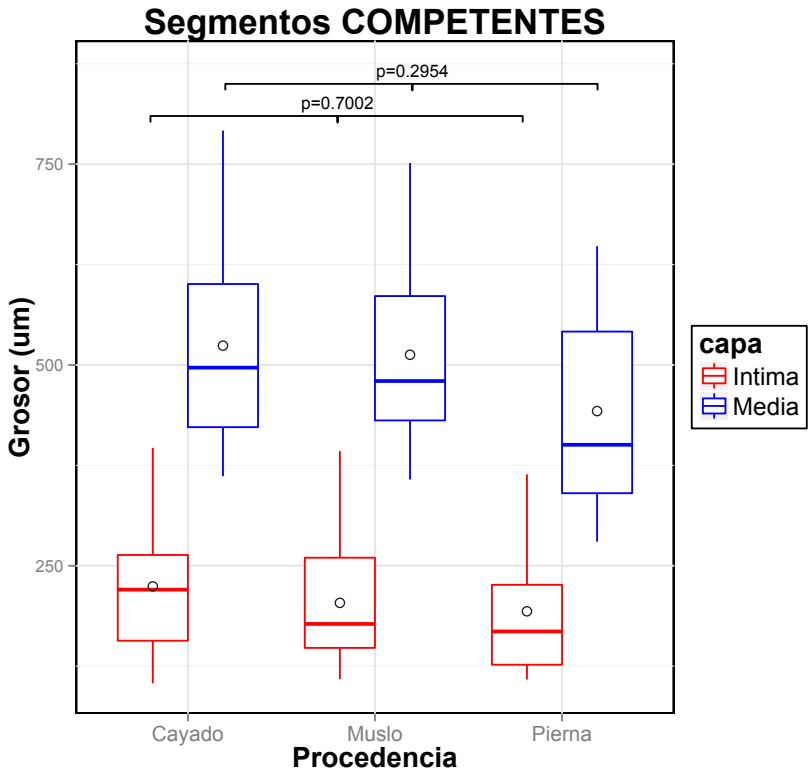

Figura 48. Distribución del grosor de las capas de las muestras de segmentos competentes, por capa y procedencia anatómica

Aunque la tabla y el gráfico indican claramente que el valor medio del grosor de las capas íntima y media de estos sujetos son mayores en las muestras procedentes de la cercanía de la unión safenofemoral que en las obtenidas en el muslo y en la pierna, el test de permutación para múltiples grupos refleja que no existen diferencias significativas en el grosor de la capa íntima (test de doble cola, $p = 0.7002$), ni en el grosor de la capa media (test de doble cola, $p = 0.2954$), para un nivel de significación de $\alpha = 0.05$.

5.1.1.3. Muestras de segmentos incompetentes procedentes de sujetos con insuficiencia venosa

En las muestras obtenidas de zonas donde la vena estaba sometida a reflujo y, por tanto, a hipertensión venosa crónica, se observa que el grosor de la capa íntima puede ser muy irregular, alternando zonas de mayor grosor con zonas de menor grosor en la misma muestra. Por ello, se han tomado medidas de grosor representativas de ambas zonas.

La figura 49 muestra dos ejemplos (secciones números 4752 y 4774) donde se aprecian zonas con gran desarrollo de la capa intimal junto a zonas más estrechas.

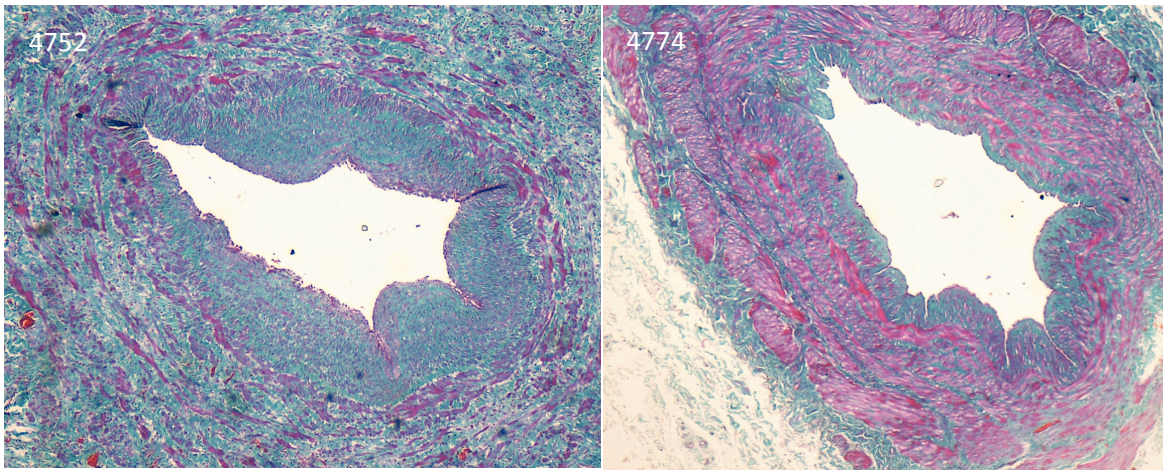

Figura 49. Alteraciones en el grosor de la íntima de la vena safena interna de pacientes con insuficiencia venosa

En la tabla 10 se resumen los valores obtenidos, tanto en la zona con mayor grosor como en la zona con menor grosor intimal, mientras que en la tabla 11 se muestran los valores obtenidos en la medición de la capa media.

Tabla 10. Medidas descriptivas del grosor de la capa íntima de las muestras de segmentos incompetentes, desagregadas por procedencia anatómica y valores globales

Grosor (μm)	Íntima de *menor* grosor				Íntima de *mayor* grosor			
	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*
Media aritmética	91.69	79.49	100.5	91.83	302.39	241.87	319.3	297.55
Desviación estándar	38.22	29.31	33.88	35.69	97.02	66.93	158.18	107.52
Mediana	81.77	70.72	91.34	83.25	306.10	253.91	312.66	304.14
Q_1	68.39	57.59	81.16	68.00	250.0	192.0	195.5	231.1
Q_3	108.20	101.39	133.24	110.30	351.2	291.7	391.7	355.5
Valor mínimo	51.79	56.99	57.95	51.79	107.55	152.96	133.33	107.55
Valor máximo	221.0	119.5	148.1	221.0	530.3	306.7	570.2	570.2
Rango	169.2	62.54	90.12	169.2	422.8	153.73	436.89	462.7
Asimetría	1.88	0.43	0.24	1.62	0.11	-0.32	0.32	0.47

Tabla 11. Medidas descriptivas del grosor de la capa media de las muestras de segmentos incompetentes, desagregadas por procedencia anatómica y valores globales

Grosor (μm)	Capa Media			
	Cayado	Muslo	Pierna	*Global*
Media aritmética	454.20	441.25	557.1	473.71
Desviación estándar	152.99	95.83	103.30	140.84
Mediana	440.16	452.44	528.89	485.33
Q_1	326.5	363.5	491.1	401.6
Q_3	577.1	518.9	656.3	575.1
Valor mínimo	199.60	325.44	432.23	199.60
Valor máximo	704.1	534.7	705.2	705.2
Rango	504.5	209.23	273.01	505.6
Asimetría	0.01	-0.16	0.29	-0.10

Los resultados de ambas tablas se representan gráficamente en la figura 50.

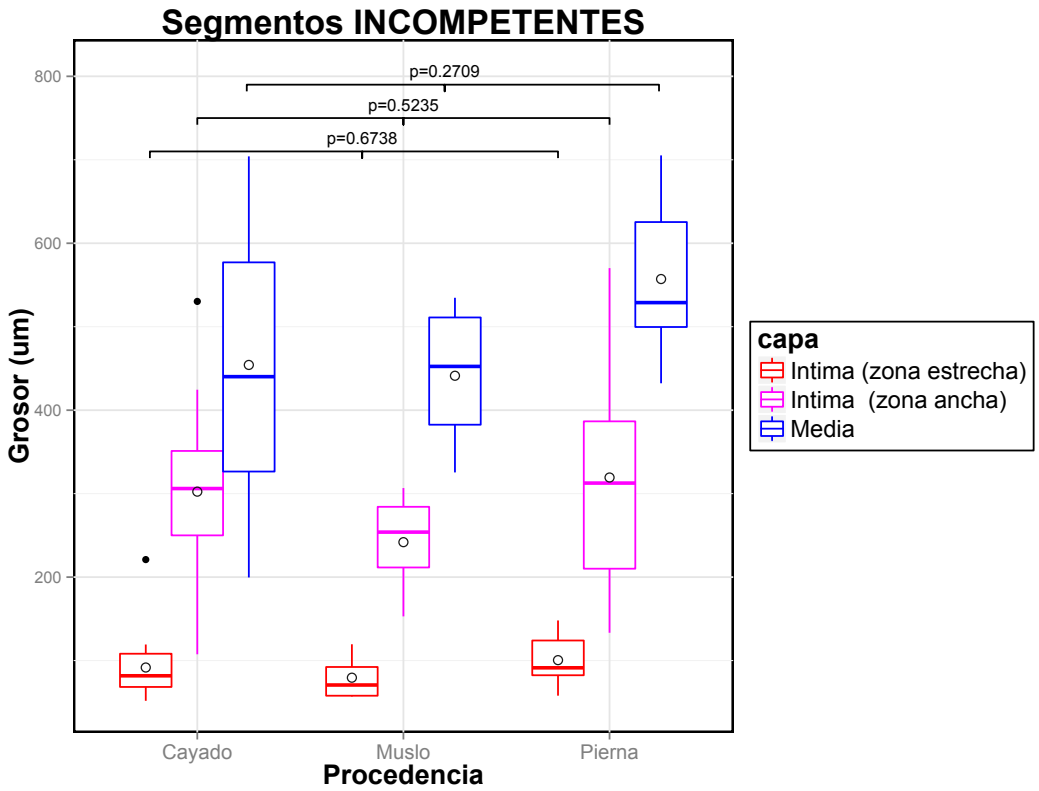

Figura 50. Distribución del grosor de las capas de las muestras de segmentos obtenidos de pacientes con insuficiencia venosa, por capa y procedencia anatómica

En la figura 50, mediante sendos puntos negros, se identifican dos valores atípicos: uno pertenece al grupo de medidas obtenidas de la zona intimal más estrecha, y el otro a la zona más gruesa de la capa íntima, y que se corresponden a las secciones números 4775 y 4848 respectivamente (figura 51).

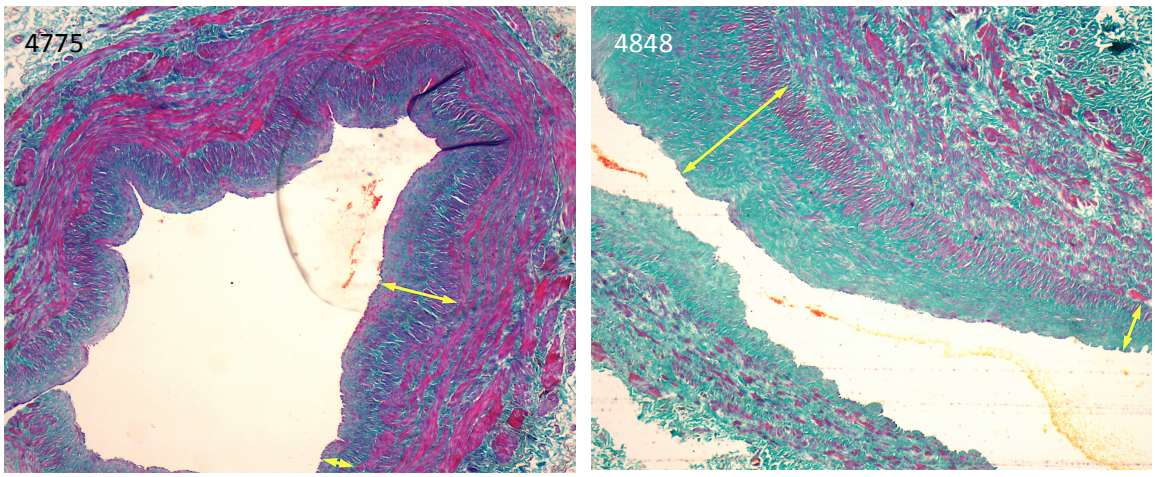

Figura 51. Muestras con valores atípicos del grosor en la capa íntima

La muestra 4775 presenta una íntima bastante gruesa en toda su extensión. En la zona más estrecha se midió un grosor medio de 220.996 μm y en la zona de mayor grosor, un grosor medio de 355.462 μm. La muestra 4848 presenta claramente zonas con gran desarrollo de la capa intimal, donde se midió un grosor medio de 530.317 μm. Tras confirmar que las medidas tomadas fueron correctas, que no hubo ningún posible error de codificación o transcripción de estos valores, y que según se ve en la figura 51 responden fielmente a lo observado en cada muestra, se decidió mantener estos valores en nuestro conjunto de datos en estudio.

Considerando los grupos de las muestras de segmentos incompetentes y fijado un nivel de significación en $\alpha = 0.05$, los resultados obtenidos del test de permutación para múltiples grupos indican que no existen diferencias significativas en el grosor de la capa íntima más estrecha (test de doble cola, $p = 0.6738$), ni en el grosor de la capa íntima de mayor grosor (test de doble cola, $p = 0.5235$), ni en el grosor de la capa media (test de doble cola, $p = 0.2709$).

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que, dentro de cada grupo (control, competente e incompetente), no hay diferencias significativas en el grosor de las capas estudiadas con la zona anatómica de procedencia de las muestras (cayado, muslo, pierna).

5.1.1.4. Comparativa intergrupo del grosor de las capas según características hemodinámicas del segmento

Tras observar que no hay diferencias en el grosor de las distintas capas de las muestras cuando se comparan dentro de su grupo según la zona anatómica de procedencia, se realizó un análisis intergrupo de acuerdo a los siguientes pares de grupos:

1 - Muestras control *vs* Muestras segmentos competentes
2 - Muestras control *vs* Muestras segmentos incompetentes
3 - Muestras segmentos competentes *vs* Muestras segmentos incompetentes

Controles *vs* Competentes

En la figura 52 se muestra la distribución del grosor de la capa íntima y media de las muestras control y de los segmentos competentes cuyos valores medidos se recogen en las tablas 8 y 9.

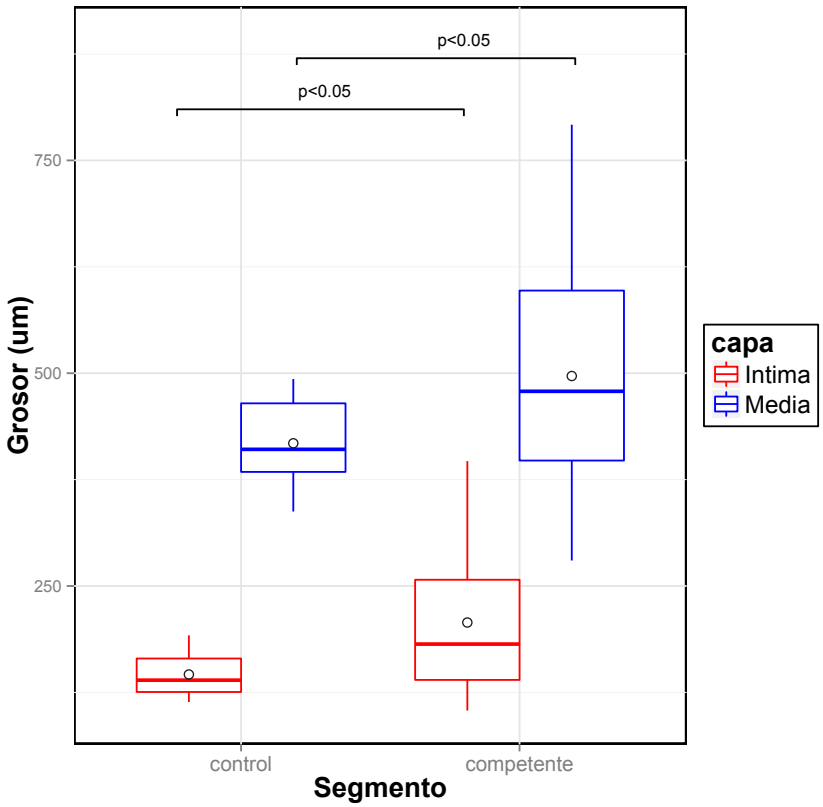

Figura 52. Comparativa del grosor de las capas íntima y media de las muestras control *vs* muestras de segmentos competentes

Los resultados del test de permutación proporcionan un valor $p = 0.008135$ para la diferencia de los valores medios de la capa íntima y un valor $p = 0.02715$ para la capa media. En ambos casos los valores medios son superiores en las muestras obtenidas de pacientes con insuficiencia venosa, aunque procedan de regiones no sometidas a reflujo.

Además, en la gráfica se observa una mayor desviación en los segmentos de las muestras competentes que en las muestras control, fundamentalmente hacia valores altos. Esta mayor dispersión de los datos se refleja en el coeficiente de variación muestral, cuyos valores se indican en la tabla 12.

Tabla 12. Valor del coeficiente de variación de los grupos de muestras de la figura 52

	Capa					
	Íntima			Media		
	Control	Competente	Valor *p*	Control	Competente	Valor *p*
Coef. Variación	0.1807	0.4076	0.0095	0.1247	0.2597	0.0164

El aumento del valor del coeficiente de variación indicado en la tabla 12 es estadísticamente significativo en ambos casos, con un valor $p = 0.00946$ para la capa intima, y un valor $p = 0.0164$ para la capa media.

Controles *vs* Incompetentes

En la figura 53 se muestra la distribución del grosor de las capas íntima y media de las muestras control y de los segmentos sometidos a reflujo venoso. En el caso de estas últimas se representa la distribución del grosor de las zonas intimales de mayor y menor grosor (tablas 8, 10 y 11).

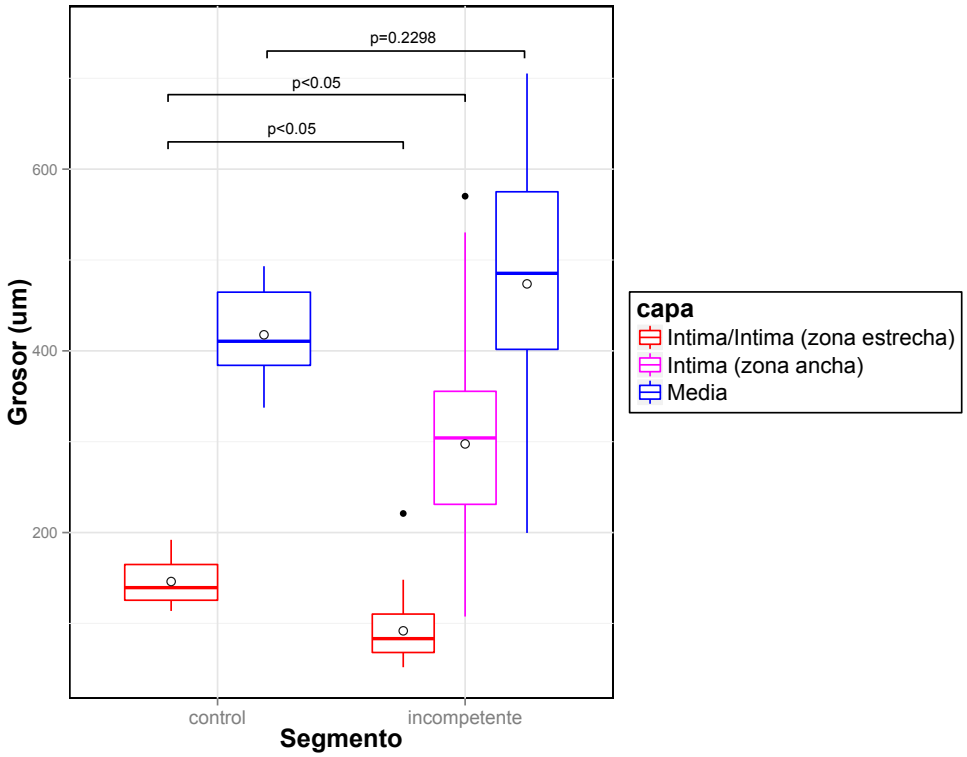

Figura 53. Comparativa del grosor de las capas de las muestras controles vs muestras de segmentos incompetentes

Como puede apreciarse, el valor medio de las zonas intimales de menor grosor de las muestras de los segmentos sometidos a reflujo venoso es inferior al de las muestras controles, al contrario que los valores medios de las zonas intimales de mayor grosor donde el valor medio es superior al de los controles. Los resultados de los test de permutación permiten establecer que las diferencias son significativas en ambos casos, con valores $p = 0.0001387$ y $p = 4.4*10^{-6}$, respectivamente.

En cambio, no hay diferencias significativas (test de doble cola, $p = 0.2298$) entre los grosores de la capa media de ambos tipos de muestras.

Por otra parte, el análisis de la desviación de los valores obtenidos muestran una mayor desviación en los valores del grosor de la capa media de las muestras de segmentos incompetentes que en el de las muestras control, siendo el coeficiente de variación muestral de 0.1247 y 0.2973 respectivamente, lo que resulta una diferencia estadísticamente significativa con un valor $p = 0.00701$.

Competentes *vs* Incompetentes

Cuando se comparan los valores medios del grosor de las capas íntima y media de las muestras procedentes de segmentos competentes con los procedentes de segmentos incompetentes (tablas 9, 10 y 11), los test de permutación reflejan que la diferencia entre el valor medio del grosor de la capa íntima de las muestras competentes, y las zonas más estrechas de la íntima de las muestras incompetentes es significativa ($p = 1*10^{-7}$). De igual forma se detectan diferencias significativas ($p = 0.0001732$) entre el grosor de la capa íntima de las muestras competentes y el de las zonas intimales de mayor grosor de las muestras incompetentes. Con respecto a la capa media, no hay diferencias significativas entre ambos tipos de muestras (test de doble cola, $p = 0.4952$).

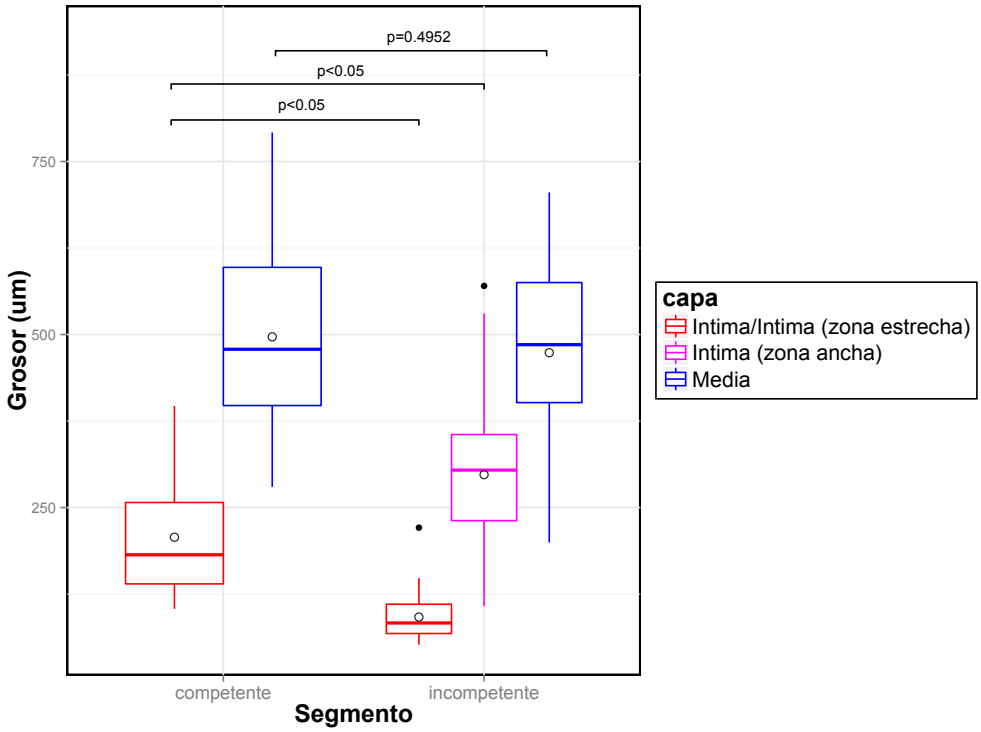

Figura 54. Comparativa del grosor de las capas de las muestras de segmentos competentes vs incompetentes

La figura 54 muestra la representación gráfica del grosor de las capas íntimas y media en segmentos competentes vs incompetentes, y en ella se observa que las desviaciones del grosor de la capa media parecen tender hacia valores más altos en los segmentos competentes, y hacia valores bajos en los segmentos incompetentes. Los valores del coeficiente de asimetría de las distribuciones (tablas 9, 10 y 11) confirman lo indicado, la distribución del grosor de ambas capas de los segmentos competentes presentan una asimetría positiva, mientras que la distribución muestral de los segmentos incompetentes tiene una asimetría negativa en la capa media y en las zonas intimales de mayor grosor, aunque la magnitud de la asimetría es muy ligera.

La disponibilidad de segmentos insuficientes competentes e incompetentes de un mismo sujeto permitió realizar un test de diferencias para muestras pareadas con objeto de buscar mayor eficiencia del contraste estadístico, evitando la confusión inducida por factores que varían entre individuos.

De 11 sujetos del estudio se dispone de pares de muestras de segmentos competente e incompetente, y en alguno de ellos se cuenta con más de un par. En la tabla 13 se identifican las 13 muestras pareadas consideradas.

Tabla 13. Listado de muestras pareadas de segmentos con insuficiencia venosa para test estadístico del grosor de las capas

Id	Competente	Incompetente
1	4713	4712
2	4739	4738
3	4741	4740
4	4749	4748
5	4751	4750
6	4753	4752
7	4769	4767
8	4769	4768
9	4806	4807
10	4808	4807
11	4812	4811
12	4819	4817
13	4827	4826

De los segmentos insuficientes competentes se dispone del grosor de la capa íntima y de la capa media. De los segmentos incompetentes se tiene 2 medidas de la capa íntima (de la zona ancha y de la zona estrecha) y del grosor de la capa media. Los valores a comparar serán los grosores de cada capa entre los dos segmentos. Con este fin, se estableció como grosor de la capa íntima de los segmentos incompetentes la media aritmética del grosor de la zona ancha y de la zona estrecha de dicha capa.

En la figura 55 se muestra la distribución de los valores de grosor de cada uno de dichos pares para ambas capas.

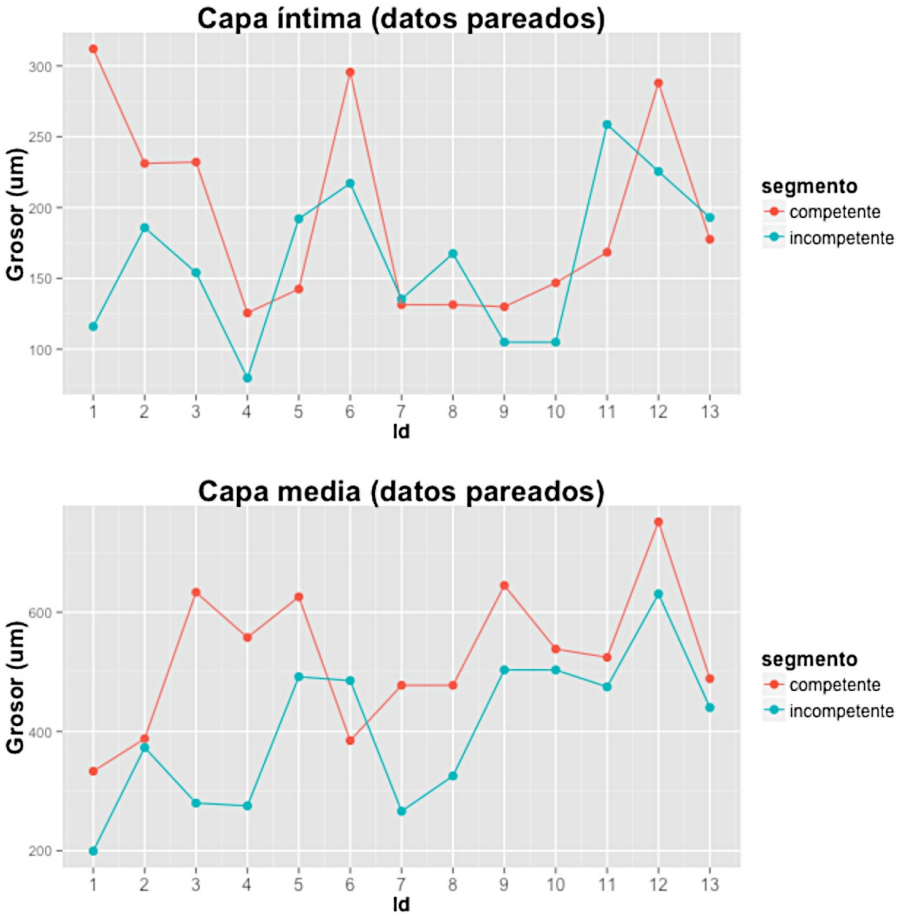

Figura 55. Distribución del grosor de las capas de las muestras pareadas de segmentos competentes vs incompetentes

En la tabla 14 se indican los valores medios del grosor de las distintas capas y segmentos, el promedio de las diferencias de grosor entre las muestras pareadas, así como el resultado de los test de significación estadística.

Tabla 14. Resultados del análisis del grosor medio para muestras pareadas

	Segmento			
	Competente	Incompetente	Competente-Incompetente	Valor *p*
Capa Intima (μm)	193.3	164.2	29.06	0.1724
Capa media (μm)	525	403.8	121.3	0.003418

Los resultados muestran que el grosor medio de la capa íntima y media es mayor en los segmentos insuficientes competentes que en los incompetentes, y que las diferencias de grosor de la capa íntima en un mismo sujeto no son significativas, mientras que las diferencias de grosor de la capa media en un mismo sujeto sí son significativas.

5.1.2. Análisis de los componentes de fibras musculares y matriz extracelular de la pared venosa

Las mediciones obtenidas de la extensión en píxeles de los componentes de fibra muscular y matriz extracelular (MEC) de la pared venosa de cada muestra, realizadas mediante el algoritmo de agrupamiento, se encuentran en el anexo 2. A partir de estas medidas en píxeles se calculó la proporción del componente de fibra muscular y la proporción de MEC en la pared venosa de cada muestra mediante las siguientes expresiones:

$$D_{fm} = \frac{Extensión\ fibras\ musculares\ (píxeles)}{Extensión\ sección\ vena\ (píxeles)}$$
$$D_{MEC} = \frac{Extensión\ matriz\ extracelular\ (píxeles)}{Extensión\ sección\ vena\ (píxeles)} \quad (5.1)$$

En la figura 56 se muestra gráficamente la magnitud de los valores medios de las proporciones D_{fm} y D_{MEC} calculadas, distinguiéndose por tipo de segmento.

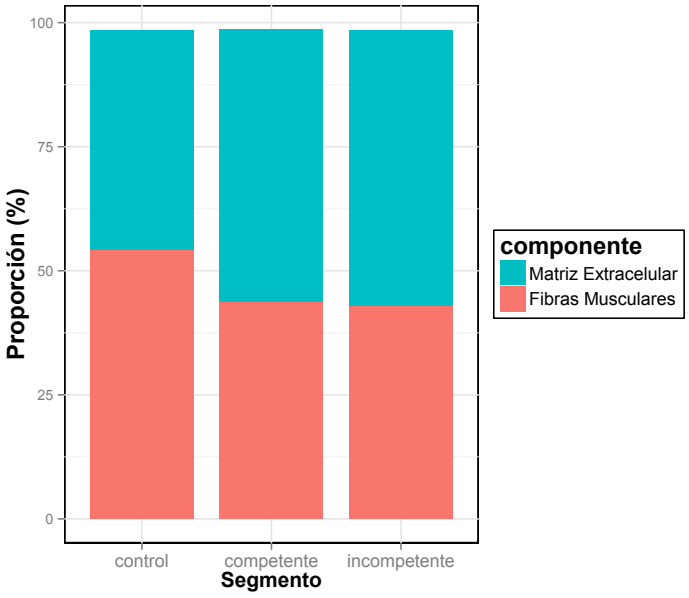

Figura 56. Valores medios de proporción de fibras musculares y MEC, por tipo de segmento

En ella se observa una disminución de la proporción de fibras musculares y un aumento de la proporción de MEC en las muestras de segmentos pertenecientes a pacientes con insuficiencia venosa con respecto a las muestras control.

En la figura 57 se muestra más detalladamente la distribución de la proporción de las fibras musculares y de la MEC.

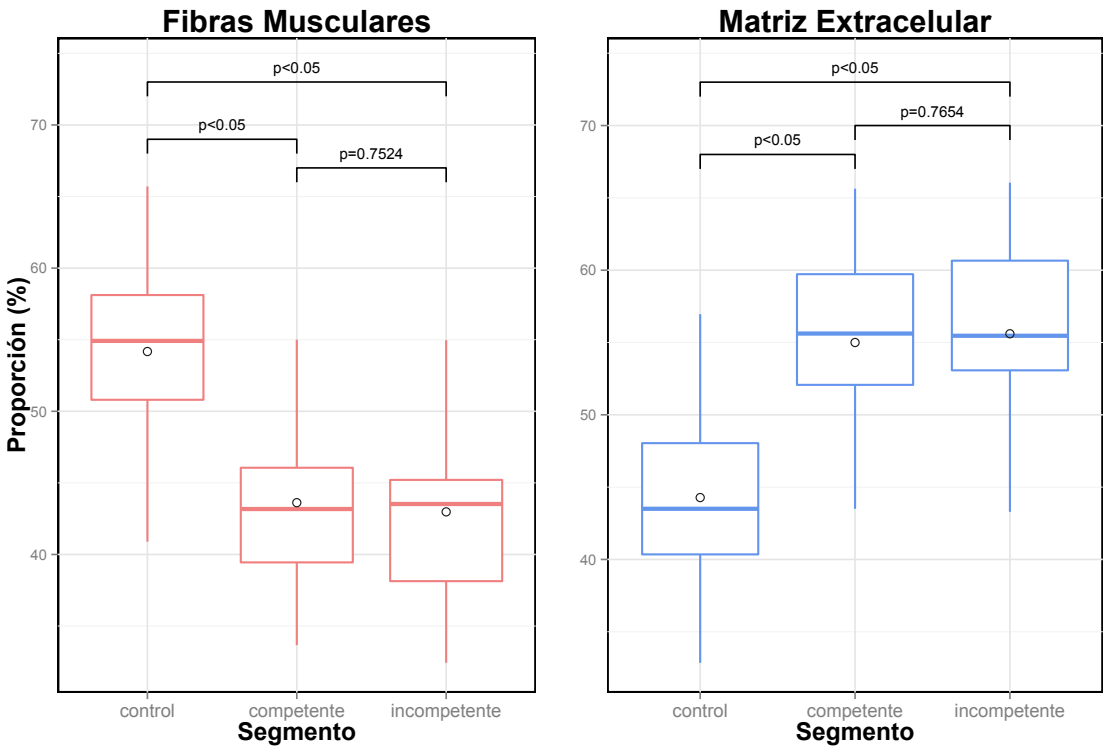

Figura 57. Distribución de la proporción de fibras musculares y MEC por tipo de segmento

En la tabla 15 se detalla numéricamente las principales medidas descriptivas de la proporción de fibras musculares y de MEC de la figura 57.

Tabla 15. Medidas descriptivas de la proporción de fibras musculares y MEC, desagregadas por tipo de segmento

$D_{fm} \parallel D_{MEC}$	Fibras musculares			Matriz extracelular		
	Control	Competente	Incompetente	Control	Competente	Incompetente
Media	54.18	43.62	42.98	44.28	55.0	55.6
Desv estándar	8.42	6.39	6.75	8.25	6.25	6.85
Mediana	54.92	43.17	43.52	43.5	55.62	55.46
Q_1	50.19	39.38	38.07	39.95	52.01	52.49
Q_3	58.43	46.12	45.71	48.9	59.8	60.68
Valor mínimo	40.89	33.67	32.43	32.85	43.5	43.29
Valor máximo	65.7	55.0	54.97	56.96	65.63	66.05
Rango	24.81	21.33	22.54	24.11	22.13	22.76
Asimetría	-0.13	0.16	0.14	0.14	-0.21	-0.19

5.1.2.1. Comparativa intergrupo de la proporción de fibras musculares y matriz extracelular según las características hemodinámicas del segmento

Se compararon los valores medios de las proporciones D_{fm} y D_{MEC} entre los diferentes tipos de segmentos, evaluando las diferencias entre los resultados que se observan en la figura 57.

Estableciendo el nivel de significación estadística en $\alpha = 0.05$, los resultados de los test de permutación reflejan que la diferencia del valor medio de la proporción de fibras musculares entre las muestras control y las muestras de segmentos competentes es significativa ($p = 0.002253$), así como la diferencia del valor medio entre las muestras controles y las muestras de segmentos incompetentes ($p = 0.002242$).

Por el contrario no se observan diferencias significativas entre los valores medios de la proporción de fibras musculares entre las muestras de segmentos competentes e incompetentes (test de doble cola, $p = 0.7524$).

El análisis estadístico de los valores medios de la proporción de matriz extracelular entre los diferentes tipos de muestras indica que las muestras control presentan diferencias estadísticamente significativas tanto cuando son comparadas con las muestras procedentes de segmentos competentes ($p = 0.001735$), como con las obtenidas de segmentos incompetentes ($p = 0.002199$). Sin embargo, la diferencia obtenida entre las medias de las muestras de segmentos competentes y las de segmentos incompetentes no es significativa (test de doble cola, $p = 0.7654$). Los resultados estadísticos indicados han sido obtenidos mediante test de significación para muestras independientes.

También se realizó un análisis de muestras pareadas a partir de 11 sujetos de los que se disponía tanto segmentos competentes como incompetentes. En la tabla 16 se identifican las 13 muestras pareadas consideradas.

Tabla 16. Listado de muestras pareadas de segmentos con insuficiencia venosa para test estadístico de la proporción de fibras musculares y MEC

Id	Competente	Incompetente
1	4713	4712
2	4739	4738
3	4741	4740
4	4749	4748
5	4751	4750
6	4753	4752
7	4769	4767
8	4769	4768
9	4806	4807
10	4808	4807
11	4812	4811
12	4819	4817
13	4827	4826

En la figura 58 se muestra la distribución de los valores de la proporción de fibras musculares y MEC de la serie de pares de muestras indicados en la tabla 16.

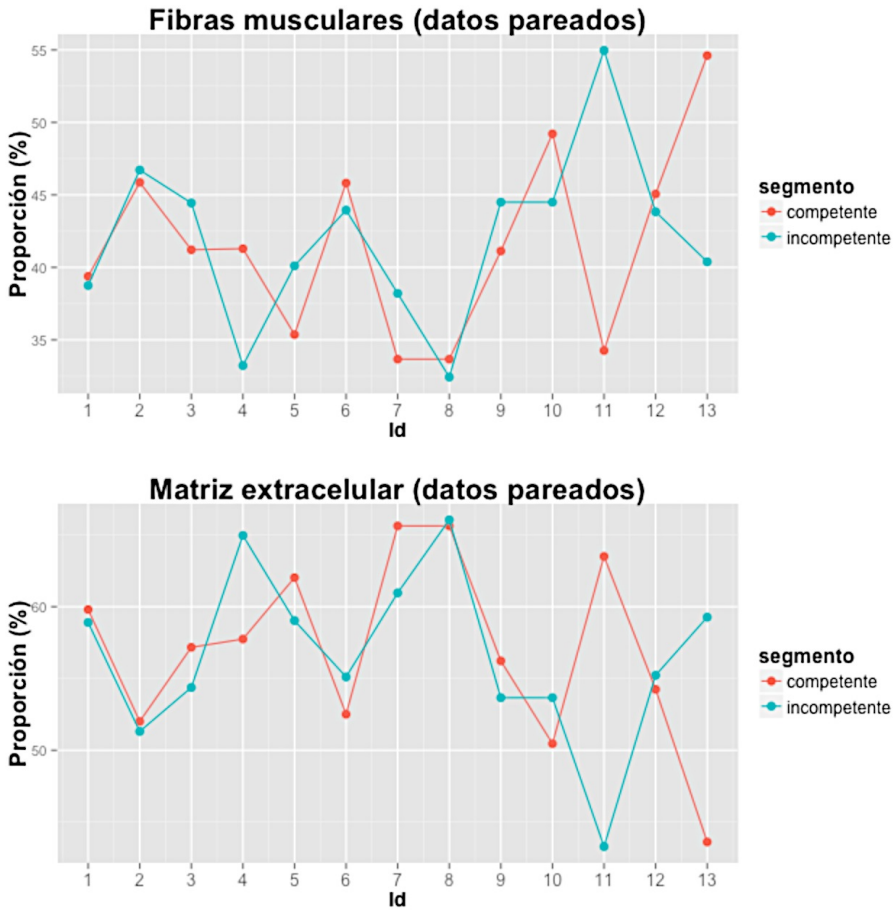

Figura 58. Distribución de la proporción de fibras musculares y MEC de las muestras pareadas de segmentos competentes vs incompetentes

El valor medio de la proporción de fibras musculares de las muestras de los segmentos competentes estudiadas es 41.579% y el valor medio en las muestras de los segmentos incompetentes es 41.9997%. El valor medio de la proporción de MEC de las muestras de los segmentos competentes es 56.966% y el valor medio en las muestras de los segmentos incompetentes es 56.601%, y el valor medio de la diferencia (competentes – incompetentes) entre los valores de la proporción de fibras musculares y de MEC en la serie de parejas estudiadas es -0.4207% y 0.3651% respectivamente.

Estableciendo el nivel de significación estadística en $\alpha = 0.05$, la ejecución del test de significación para datos pareados proporciona un valor $p = 0.8538$ para la diferencia en la proporción de fibras musculares, luego se acepta la hipótesis nula de igualdad de medias concluyendo que la diferencia en los valores medios de la proporción de fibras musculares entre las muestras de segmentos competentes e incompetentes de un mismo sujeto no es significativa.

La ejecución del test de significación para datos pareados proporciona un valor de $p = 0.8513$ para la diferencia en la proporción de MEC, luego se acepta la hipótesis nula de igualdad de medias concluyendo que la diferencia en los valores medios de la proporción

de la MEC entre las muestras de segmentos competentes e incompetentes de un mismo sujeto no es significativa.

Estos últimos resultados confirman lo previamente obtenido con el test de diferencias para muestras independientes: las diferencias observadas entre las muestras de segmentos competentes e incompetentes en cuanto a la proporción de los componentes de la pared venosa no es significativa.

5.1.2.2. Comparativa intergrupo de la proporción de fibras musculares y matriz extracelular según procedencia anatómica del segmento

A continuación se estudia si existe relación entre las proporciones de fibras musculares y MEC de la pared venosa y el segmento anatómico del que se obtuvieron las muestras (cayado, muslo y pierna).

Dado que no se encontraron diferencias significativas en la proporción de las componentes estudiadas entre las muestras de segmentos competentes e incompetentes se agruparon ambos tipos de muestras para abordar este análisis. Por el contario, no se han considerado las muestras control dado el pequeño número de las mismas (3 muestras de cayado, 1 muestra del muslo y 2 muestras de la pierna) puesto que su inclusión restaría validez a los resultados que se obtuvieran.

Fibras musculares

En la tabla 17 se indica el valor de la media muestral y el intervalo de confianza (IC) del 95% para la media de la proporción de fibras musculares en muestras con insuficiencia venosa, para cada lugar de procedencia de las muestras (cayado, muslo y pierna). Y en la figura 59 se muestran gráficamente los resultados obtenidos. Mediante puntos negros se indica la proporción de la componente de fibra muscular de cada muestra. Para cada región de procedencia se señala el IC del valor medio de la proporción de fibras musculares mediante un segmento de color rojo. Cada segmento contiene un círculo rojo hueco situado sobre el valor medio muestral.

Tabla 17. Media muestral e IC de la proporción de fibras musculares según procedencia de la muestra

D_{fm}	Fibras musculares	
	Media muestral	IC (95%)
Cayado	43.93	[41.44, 46.77]
Muslo	43.19	[39.72, 46.91]
Pierna	42.06	[38.78, 47.41]

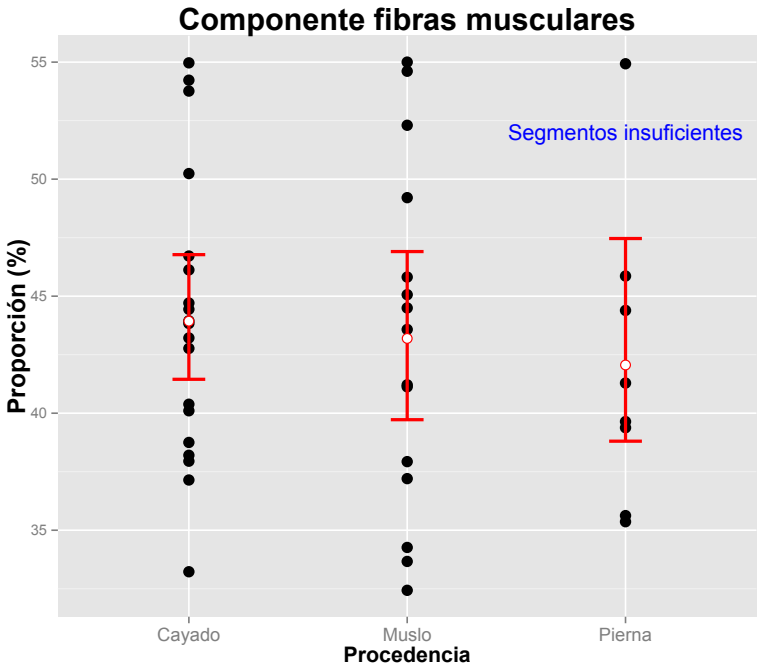

Figura 59. IC de la proporción media de fibras musculares según procedencia de las muestras con insuficiencia venosa

El valor de la media muestral de la proporción de fibras musculares disminuye desde la región proximal a la región distal.

Gráficamente se observa que la disposición y amplitud de los intervalos de confianza para el valor medio descartan la existencia de una posible relación, a nivel poblacional, entre la proporción de fibras musculares y la región de procedencia de las muestras. Para comprobar formalmente que no existe tal relación entre las variables, se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de las medias mediante un test de permutación para más de dos grupos independientes. Con un nivel de significación en $\alpha = 0.05$, el test de significación refleja que no existen diferencias significativas en la proporción del área ocupada por las fibras musculares presentes en la pared de las venas safenas internas pertenecientes a pacientes con insuficiencia venosa, independientemente de que la muestra se obtenga a nivel del cayado, del muslo o la pierna (test de doble cola, $p = 0.7952$).

Matriz extracelular

El estudio realizado para la proporción de la componente fibra muscular también se realizó sobre la componente de MEC. El IC del 95% para su valor medio junto con el valor de la media muestral son indicados en la tabla 18 para cada lugar de procedencia de las muestras.

Tabla 18. Media muestral e IC de la proporción de matriz extracelular según procedencia de la muestra

D_{MEC}	Matriz extracelular	
	Media muestral	IC (95%)
Cayado	54.69	[51.78, 57.15]
Muslo	55.34	[51.66, 58.78]
Pierna	56.61	[51.16, 59.81]

La figura 60 muestra las proporciones de MEC según la procedencia del segmento con insuficiencia venosa. Sobre la imagen se ha representado el mismo tipo de información que la mencionada para la figura 59.

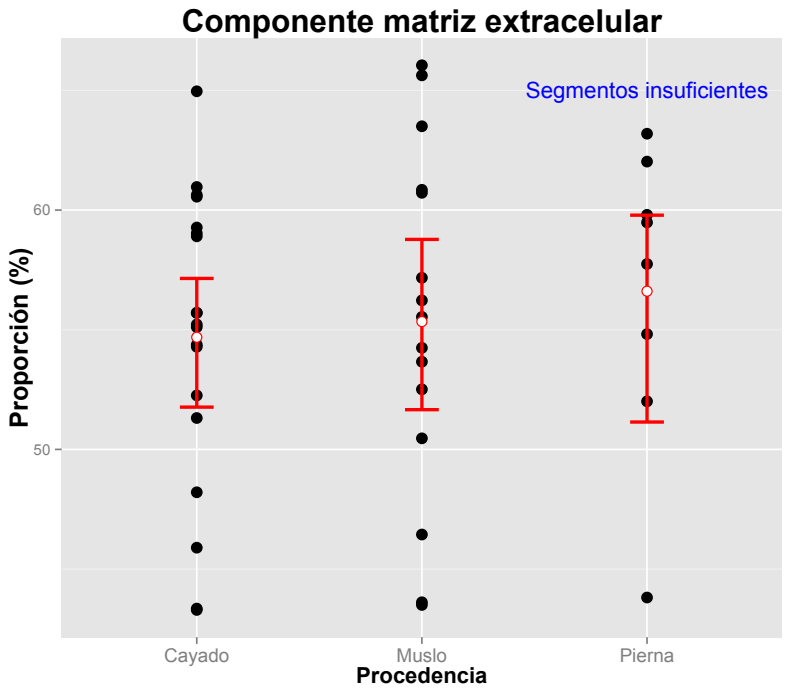

Figura 60. IC de la proporción media de matriz extracelular según procedencia de las muestras con insuficiencia venosa

Al igual que sucedió con el análisis de la proporción fibras musculares, la proporción de MEC en los segmentos sometidos a reflujo venoso, independientemente del lugar del que se extrajo la muestra, no permite obtener diferencias significativas. El test de contraste de igualdad de las medias confirma el resultado (test de doble cola, $p = 0.7863$).

5.1.3. Análisis del componente de fibras elásticas de la pared venosa

Las medidas obtenidas de la extensión en píxeles de fibras elásticas para cada muestra mediante el proceso de segmentación de imágenes basado en el valor umbral se indican

en el anexo 3. A partir de las mediciones realizadas se ha calculado la proporción de fibras elásticas mediante la siguiente expresión:

$$D_{fe} = \frac{Extensión\ fibras\ elásticas\ (píxeles)}{Extensión\ sección\ vena\ (píxeles)} \qquad (5.2)$$

El valor medio de dichas proporciones, D_{fe}, en las capas íntima/media y adventicia para los diferentes tipos de segmentos se indican en la tabla 19.

Tabla 19. Valor medio de la proporción de fibras elásticas por tipo de segmento, desagregadas por capas de la pared venosa

Tipo de muestra	Capa	Valor medio D_{fe}
Control	Intima/media	10.157
Control	Adventicia	12.240
Competente	Intima/media	4.898
Competente	Adventicia	7.208
Incompetente	Intima/media	3.959
Incompetente	Adventicia	6.767

En la figura 61 se representan gráficamente estos valores medios, donde se observa que la proporción de fibras elásticas es menor en las capas íntima y media, que en la capa adventicia.

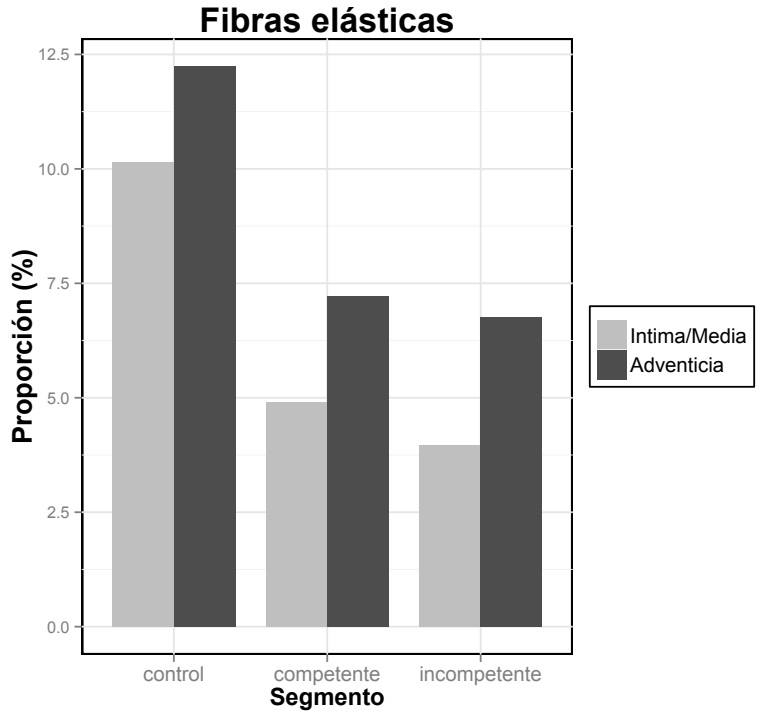

Figura 61. Valores medios de la proporción de fibras elásticas por capa y tipo de segmento

En la figura 62 se muestra el valor promedio del parámetro D_{fe} para todas las capas de la pared venosa, distinguiéndose por tipo de vena, observándose una disminución en los segmentos con insuficiencia venosa con respecto a las muestras control.

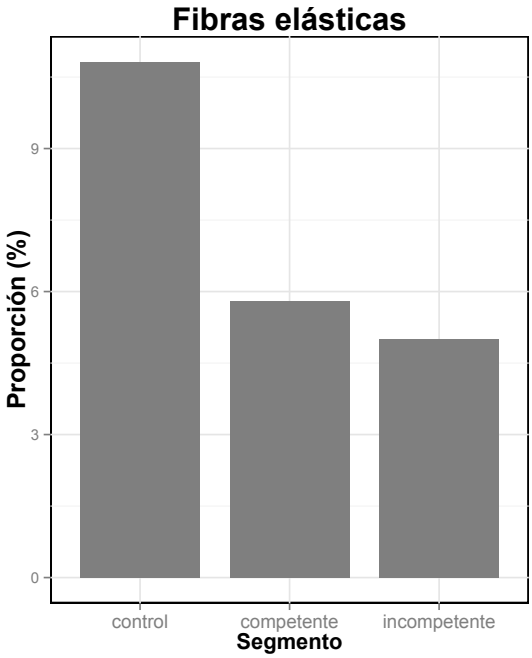

Figura 62. Valores medios de la proporción de fibras elásticas por tipo de segmento

Y la figura 63 muestra la distribución de la proporción de fibras elásticas según el segmento venoso.

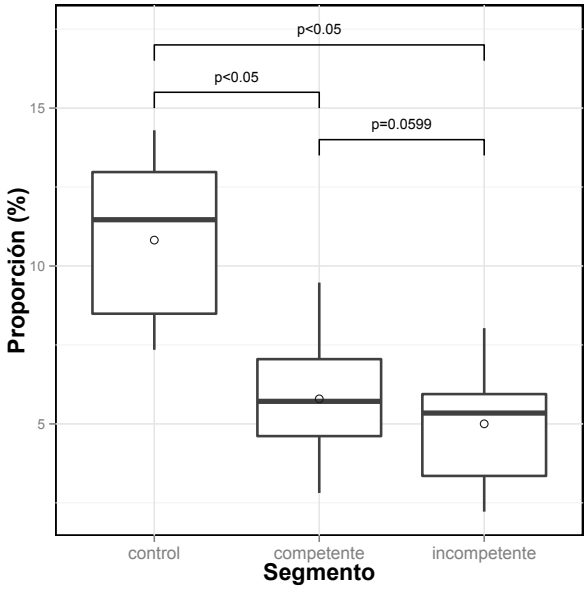

Figura 63. Distribución de la proporción de fibras elásticas por tipo de segmento

En la tabla 20 se detalla numéricamente las principales medidas descriptivas de la proporción de fibras elásticas de la figura 63.

Tabla 20. Medidas descriptivas de la proporción de fibras elásticas, desagregadas por tipo de segmento

D_{fe}	Segmento		
	Control	Competente	Incompetente
Media	10.82	5.79	5.0
Desv estándar	2.49	1.74	1.53
Mediana	11.46	5.71	5.34
Q_1	8.49	4.56	3.35
Q_3	12.97	7.09	5.94
Valor mínimo	7.35	2.81	2.22
Valor máximo	14.3	9.48	8.03
Rango	6.95	6.66	5.81
Asimetría	-0.28	-0.05	-0.20

5.1.3.1. Comparativa intergrupo de la proporción de fibras elásticas según características hemodinámicas del segmento

Se compararon los valores medios de la proporción de fibras elásticas presentes en los diferentes tipos de segmentos. Los resultados indican que la diferencia del valor medio de la proporción en las muestras control y en las muestras de segmentos competentes es significativa ($p = 5*10^{-7}$), así como la diferencia entre el valor medio de las muestras control y el de las muestras de segmentos incompetentes ($p = 2*10^{-7}$). Sin embargo la diferencia no es significativa cuando se compara la proporción de fibras elásticas de los segmentos competentes e incompetentes (test de doble cola, $p = 0.05988$), aunque el valor medio es mayor en las muestras de segmentos de vena no sometidos a reflujo.

De doce de los sujetos sometidos a intervención quirúrgica pudieron extraerse un total de 14 muestras pareadas (competente e incompetente), identificándose tales muestras en la tabla 21.

Tabla 21. Listado de muestras pareadas de segmentos con insuficiencia venosa para test estadístico de la proporción de fibras elásticas

Id	Competente	Incompetente
1	4713	4712
2	4726	4733
3	4739	4738
4	4741	4740
5	4749	4748
6	4751	4750
7	4753	4752
8	4769	4767
9	4769	4768
10	4806	4807
11	4808	4807
12	4812	4811
13	4819	4817
14	4827	4826

Por su parte, la figura 64 representa los valores de cada uno de dichos pares, apreciándose que la proporción de fibras elásticas es generalmente mayor en los segmentos competentes que en los segmentos incompetentes. Numéricamente el valor medio de la proporción de fibras elásticas en los segmentos competentes es del 6.864% y en los incompetentes es del 5.288%, por lo que la diferencia entre los valores de la proporción de fibras elásticas en la serie de parejas estudiadas es del 1.576%.

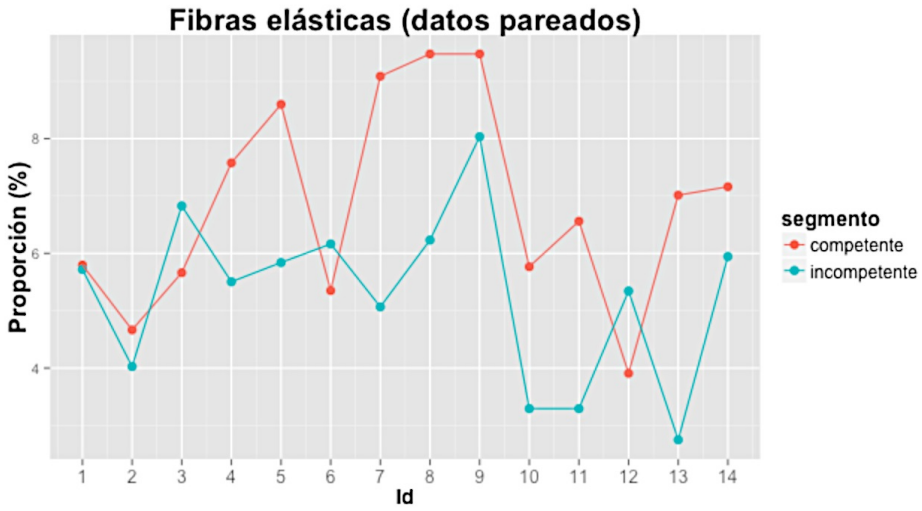

Figura 64. Distribución de la proporción de fibras elásticas de las muestras pareadas de segmentos competentes e incompetentes

La ejecución del test de significación para datos pareados proporciona un valor de $p = 0.01074$, lo que permite rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias concluyendo que la diferencia en los valores medios de la proporción de fibras elásticas entre las muestras de segmentos competentes e incompetentes de un mismo sujeto es significativa.

5.1.3.2. Comparativa intergrupo de la proporción de fibras elásticas según procedencia anatómica del segmento

El estudio de las diferencias en la proporción de fibras elásticas en función de la región anatómica no incluye a las muestras controles debido a su escaso número (ver tabla 7).

En la tabla 22 se indica el valor de la media muestral y el intervalo de confianza del 95% de la proporción de fibras elásticas en las muestras de segmentos insuficientes competentes, para cada región de procedencia, mostrándose su representación gráfica en la figura 65.

Tabla 22. Media muestral e IC de la proporción de fibras elásticas en muestras de segmentos competentes, según procedencia de la muestra

D_{fe}	Fibras elásticas	
	Media muestral	IC (95%)
Cayado	5.610	[4.789, 6.383]
Muslo	5.659	[4.635, 6.782]
Pierna	6.194	[5.430, 7.027]

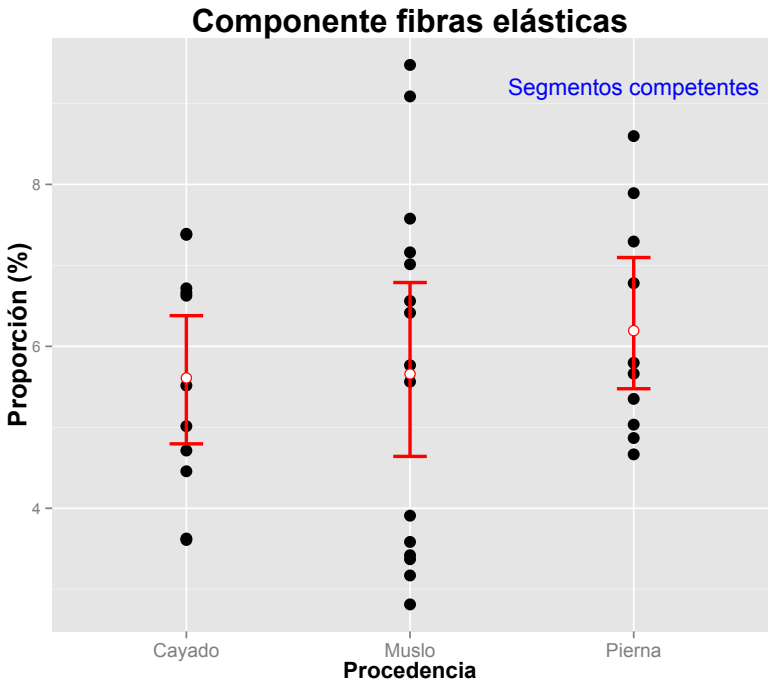

Figura 65. IC de la proporción de fibras elásticas según procedencia de las muestras de segmentos competentes

En dicha figura se aprecia la disposición y amplitud de los intervalos de confianza para el valor medio, mostrándose superpuestos entre ellos, por lo que se descarta una relación lineal, a nivel poblacional, entre la proporción de las fibras elásticas y la región de procedencia de las muestras. Este resultado se confirmó mediante la realización de

un contraste de hipótesis de igualdad de medias entre las tres procedencias distintas de las muestras (test de doble cola, $p = 0.7015$).

El mismo análisis se realizó sobre el conjunto de muestras obtenidas de segmentos incompetentes, mostrando la tabla 23 los valores de la media muestral y el intervalo de confianza del 95% de la proporción de fibras elásticas, para cada región de procedencia de las muestras.

Tabla 23. Media muestral e IC de la proporción de fibras elásticas en muestras de segmentos incompetentes, según procedencia de la muestra

D_{fe}	Fibras elásticas	
	Media muestral	IC (95%)
Cayado	5.232	[4.655, 5.725]
Muslo	4.128	[2.592, 6.848]
Pierna	4.858	[3.701, 6.113]

En la figura 66 se muestran gráficamente los resultados obtenidos para el conjunto de muestras de segmentos incompetentes.

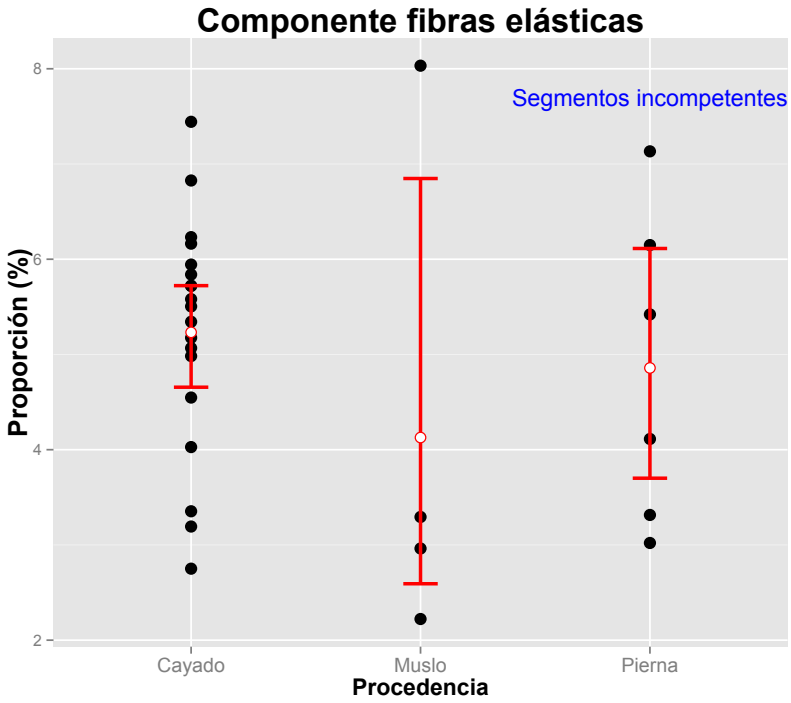

Figura 66. IC de la proporción media de fibras elásticas según procedencia de las muestras de segmentos incompetentes

El test de significación para múltiples grupos refleja que tampoco existen diferencias significativas en la proporción de fibras elásticas (test de doble cola, $p = 0.422$) con la procedencia de la muestra.

Es decir, la proporción de fibras elásticas no varía con la región anatómica de procedencia del segmento en los sujetos con insuficiencia venosa, ya esté sometido dicho segmento a reflujo o no lo esté (incompetentes y competentes).

5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Se analizó la existencia de relación lineal (asociación mutua) entre los parámetros anteriormente medidos sobre las muestras y la edad o sexo del sujeto. Los parámetros sobre los que se estudia la dependencia son el grosor de las capas íntima y media, la proporción de fibras musculares, la proporción de MEC y la proporción de fibras elásticas. En el anexo 4 se listan los datos que permitieron estudiar la posible asociación de dichas variables con la edad y el sexo.

Como paso previo se estudió la existencia de valores atípicos en los diferentes datos, detectándose valores anormales en el grosor de la capa íntima. En la figura 67 se muestran los boxplot de la distribución del grosor de la capa íntima según el tipo de segmento. En la figura se observa la existencia de un valor atípico en los segmentos incompetentes, según el criterio indicado mediante la expresión (4.2), que corresponde a la sección número 4863. Dicha muestra se excluyó del análisis de la capa íntima.

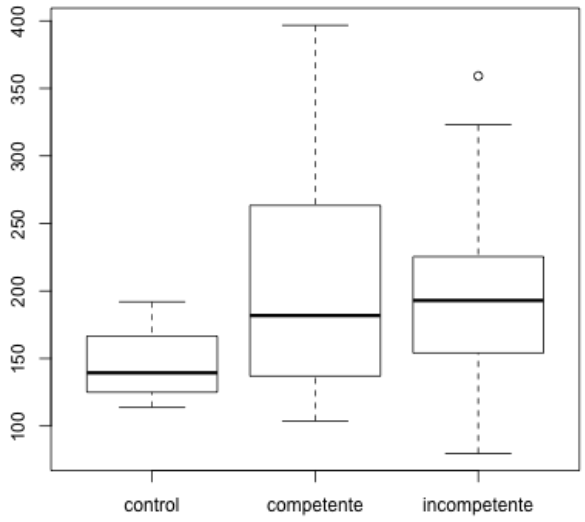

Figura 67. Localización de valores atípicos en el grosor de la capa íntima

5.2.1. Correlación con la edad del sujeto

En la tabla 24 se indican los valores calculados del coeficiente de correlación muestral de Pearson y el valor p del contraste de la hipótesis de no asociación entre cada una de las variables con la edad del sujeto.

Tabla 24. Coeficiente de correlación ρ y valor p para el contraste de hipótesis de no asociación entre las variables y la edad del sujeto

ρ muestral (valor p)	Tipo de segmento		
	control	competente	incompetente
Capa Íntima	0.376 (p = 0.5973)	0.0935 (p = 0.5922)	0.00618 (p = 0.976)
Capa Media	-0.7006 (p = 0.3007)	-0.2423 (p = 0.1609)	-0.07117 (p = 0.7249)
Proporción FM	-0.6666 (p = 0.2907)	-0.08045 (p = 0.7269)	-0.1766 (p = 0.4669)
Proporción MEC	0.626 (p = 0.2986)	0.07114 (p = 0.7573)	0.1541 (p = 0.5275)
Proporción FE	0.7517 (p = 0.2001)	-0.01408 (p = 0.9366)	0.1966 (p = 0.3232)

FM: fibras musculares, MEC: matriz extracelular, FE: fibras elásticas

Con un nivel de significación $\alpha = 0.05$, las pruebas de significación estadística muestran que no existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula en ninguno de los casos analizados, de manera que no existe asociación entre las variables estudiadas con un nivel de confianza del 95%.

Las figuras 68, 69, 70, 71 y 72 muestran las gráficas de dispersión de los datos analizados, incluyendo la recta de regresión lineal. Las escalas de ambos ejes se han normalizado con la finalidad de que la pendiente de la recta de regresión refleje exactamente el valor del coeficiente de correlación muestral.

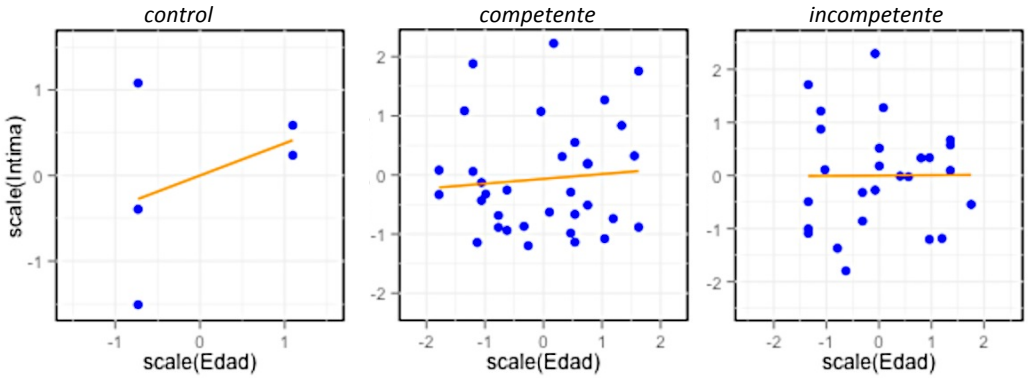

Figura 68. Recta de regresión muestral del grosor de la capa íntima versus edad, por tipo de segmento

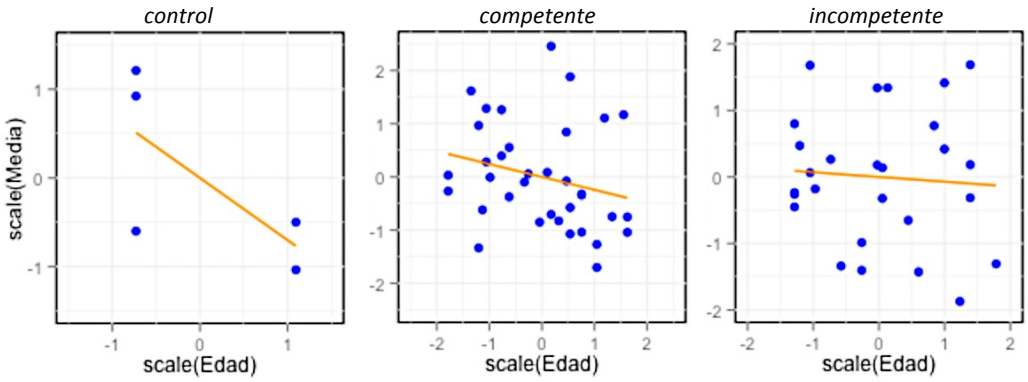

Figura 69. Recta de regresión muestral del grosor de la capa media versus edad, por tipo de segmento

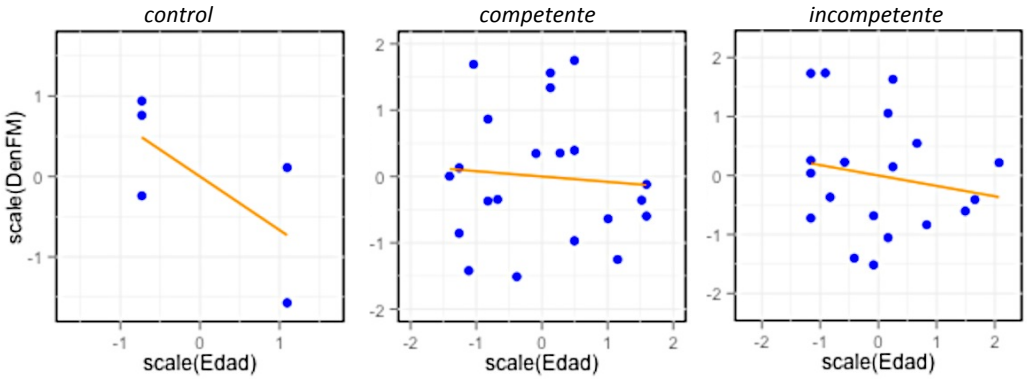

Figura 70. Recta de regresión muestral de la proporción de fibras musculares versus edad, por tipo de segmento

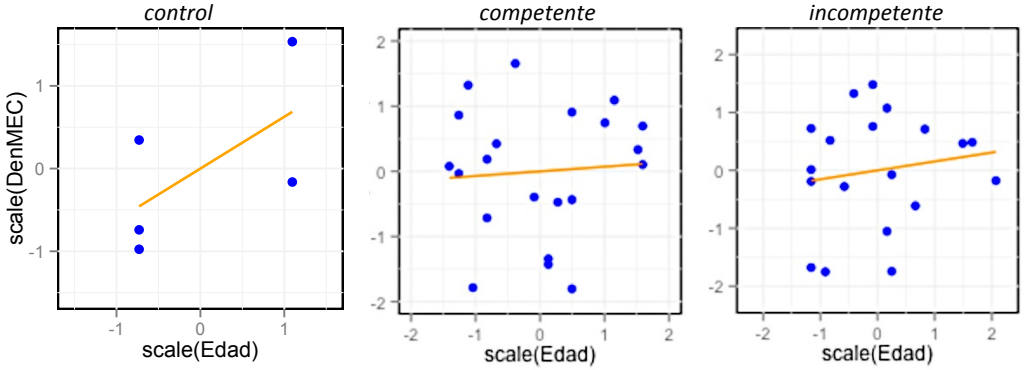

Figura 71. Recta de regresión muestral de la proporción de matriz extracelular versus edad, por tipo de segmento

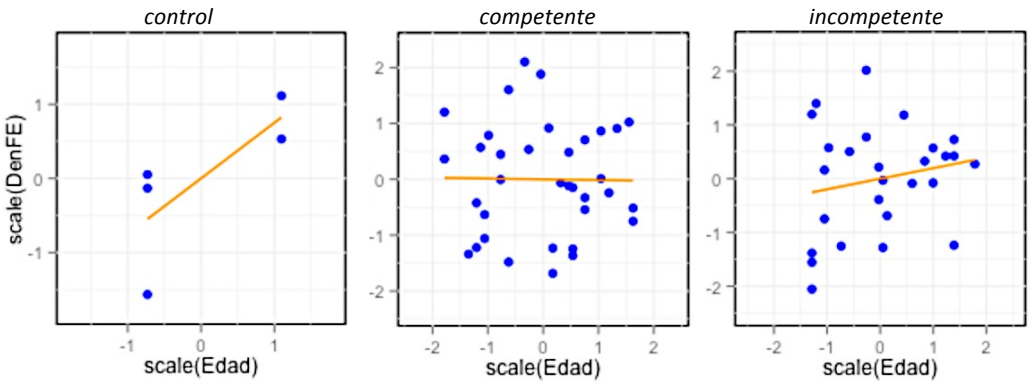

Figura 72. Recta de regresión muestral de la proporción de fibras elásticas versus edad, por tipo de segmento

5.2.2. Correlación con el sexo del sujeto

En la tabla 25 se indican los valores calculados del coeficiente de correlación biserial puntual muestral y el valor p del contraste de la hipótesis de no asociación entre cada una de las variables con el sexo del sujeto. No se muestran datos para las muestras control al no disponer del sexo de los sujetos para este tipo de muestras.

Tabla 25. Coeficiente de correlación r_{bp} y valor p para el contraste de hipótesis de no asociación entre las variables y el sexo del sujeto

r_{bp} muestral (valor p)	Tipo de segmento	
	competente	incompetente
Capa Íntima	-0.02807 (p = 0.8702)	-0.2297 (p = 0.2337)
Capa Media	-0.1548 (p = 0.3808)	-0.04595 (p = 0.8147)
Proporción FM	-0.04715 (p = 0.8337)	-0.3858 (p = 0.08839)
Proporción MEC	0.06633 (p = 0.7728)	0.3702 (p = 0.1038)
Proporción FE	0.1136 (p = 0.5054)	**0.3803 (p = 0.0394)**

FM: fibras musculares, MEC: matriz extracelular, FE: fibras elásticas

Estableciendo un nivel de significación en $\alpha = 0.05$, los resultados de las pruebas de significación estadística muestran que no existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula en ninguno de los casos analizados, de manera que no existe asociación entre las variables estudiadas, con un nivel de confianza del 95%, excepto para la variable proporción de fibras elásticas en las muestras de segmentos incompetentes.

En las figuras 73, 74, 75, 76 y 77 se muestran las gráficas de dispersión de los datos en función del sexo del sujeto, incluyendo la línea de regresión.

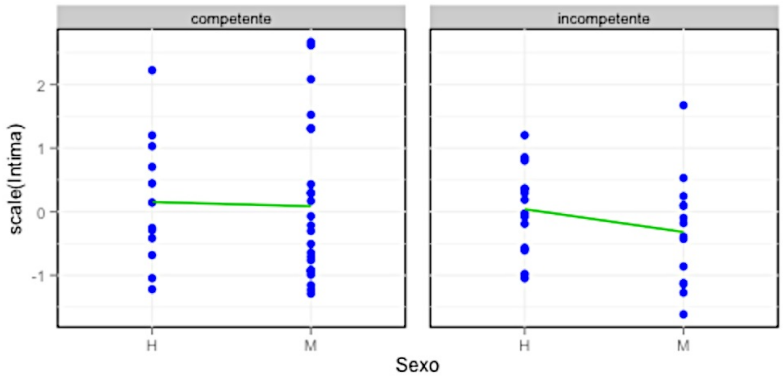

Figura 73. Recta de regresión muestral del grosor de la capa íntima versus sexo, por tipo de segmento

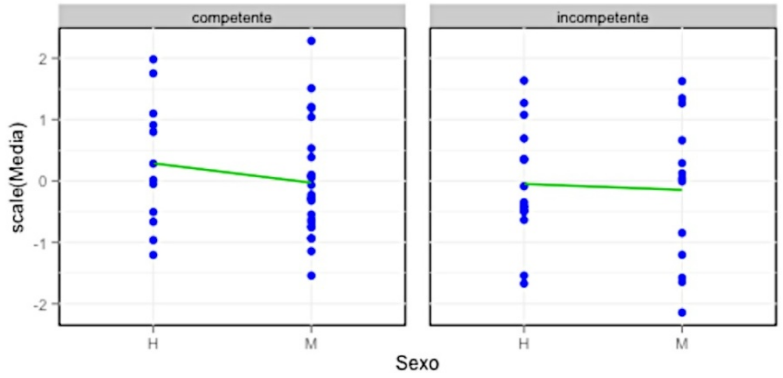

Figura 74. Recta de regresión muestral del grosor de la capa media versus sexo, por tipo de segmento

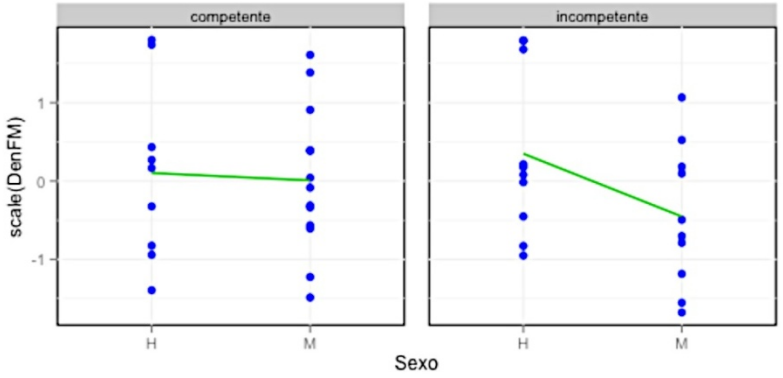

Figura 75. Recta de regresión muestral de la proporción de fibras musculares versus sexo, por tipo de segmento

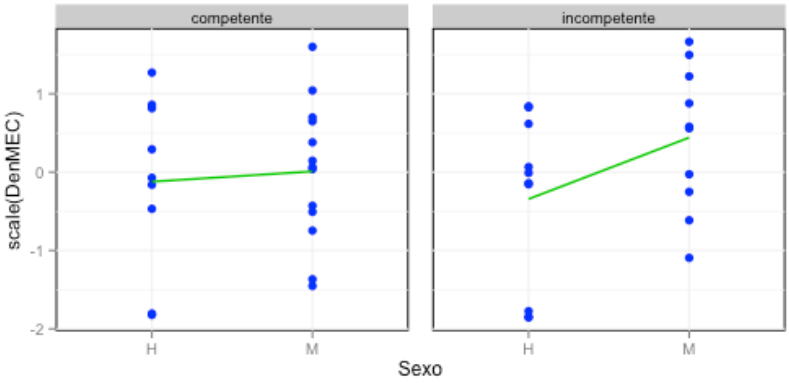

Figura 76. Recta de regresión muestral de la proporción de matriz extracelular versus sexo, por tipo de segmento

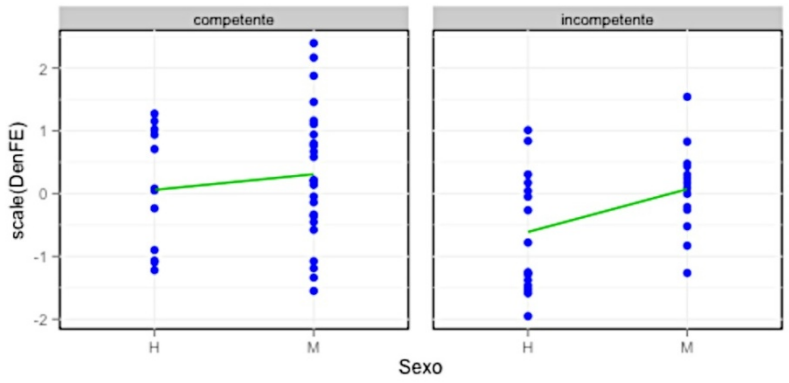

Figura 77. Recta de regresión muestral de la proporción de fibras elásticas versus sexo, por tipo de segmento

5.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

La observación de las imágenes de las muestras de la pared venosa permitieron realizar un análisis morfológico de las mismas, cuya descripción cualitativa de las características observadas se presenta en este apartado.

5.3.1. Análisis de las capas de la pared venosa insuficiente

Desde un punto de vista morfológico se observan cambios estructurales de distinta magnitud en las diferentes capas de la pared de la vena insuficiente, tanto en segmentos competentes como incompetentes en relación con las muestras control.

En las muestras con tinción de tricrómico de Masson se aprecia un incremento de grosor en la capa íntima de las venas varicosas debido al aumento de la matriz extracelular (figuras 78.a y 78.c). La superficie de esta capa se muestra irregular con zonas en las que se aprecia daño de la capa endotelial (figura 78.d). También se advierte acumulación de contenido de fibra muscular en las proximidades del endotelio, que podría contribuir también al engrosamiento de la capa.

En la capa media se observan agrupaciones de músculo liso separadas por matriz extracelular, no observándose continuidad (conexión) entre los haces de fibras musculares a lo largo del perímetro de la pared (figura 78.b). Estos haces presentan una orientación más irregular en algunas zonas, distinta a la que cabría esperar (longitudinal o circular).

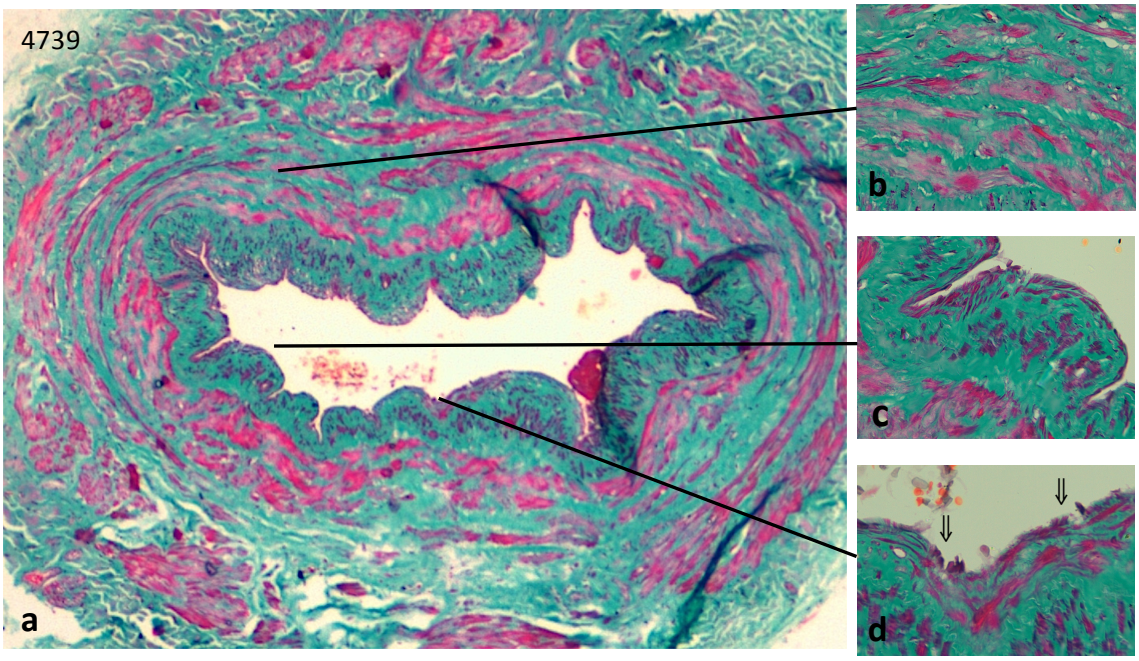

Figura 78. a. Pared venosa insuficiente (4x). **b.** Desconexión haces fibra muscular (20x). **c.** Colagenización (40x). **d.** Daños endotelio y acumulación de CML (40x)

El uso del anticuerpo Ki67 que marca los núcleos en mitosis permite determinar la existencia de proliferación celular en la pared venosa. En la inmunotinción con anti-Ki67 se interpretaron como positivos los núcleos teñidos de color marrón intenso (figura 79).

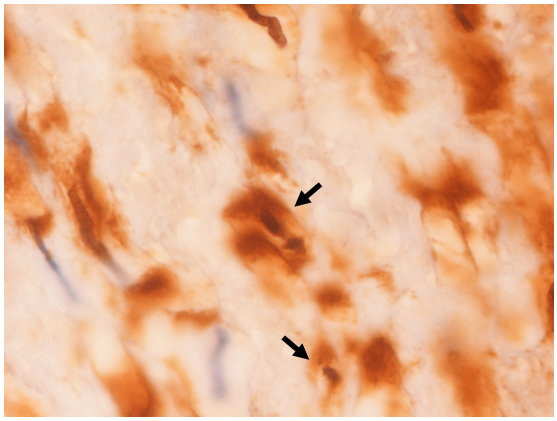

Figura 79. Aspecto de los núcleos marcados con anti-Ki67 en la pared de la vena safena (puntas de flecha)

La figura 80.a muestra la pared de una vena control, en la que se aprecia la ausencia de núcleos marcados con la proteína anti-Ki67 en la capa íntima o media, únicamente fue posible detectar alguno de estos núcleos en la capa adventicia de la pared en relación con los microvasos (figura 80.b).

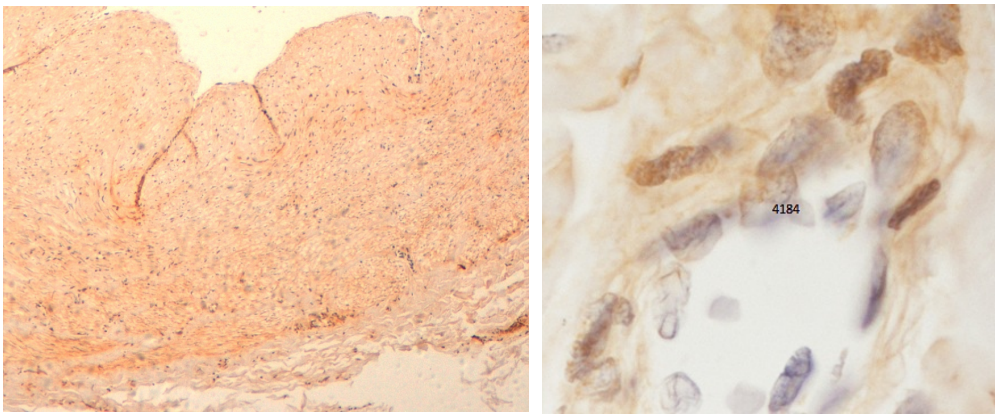

Figura 80. a. Inmunotinción con anti-Ki67 de pared de vena control. **b.** Núcleos marcados en microvasos en capa adventicia de vena control

En la figura 81 y 82 se muestra el resultado de la inmunotinción con anti-Ki67 de venas insuficientes competentes e incompetentes, respectivamente. Es posible observar que el marcaje se distribuye fundamentalmente en la capa media de la pared venosa, existiendo mayor intensidad de marcaje en las muestras competentes que en las muestras incompetentes.

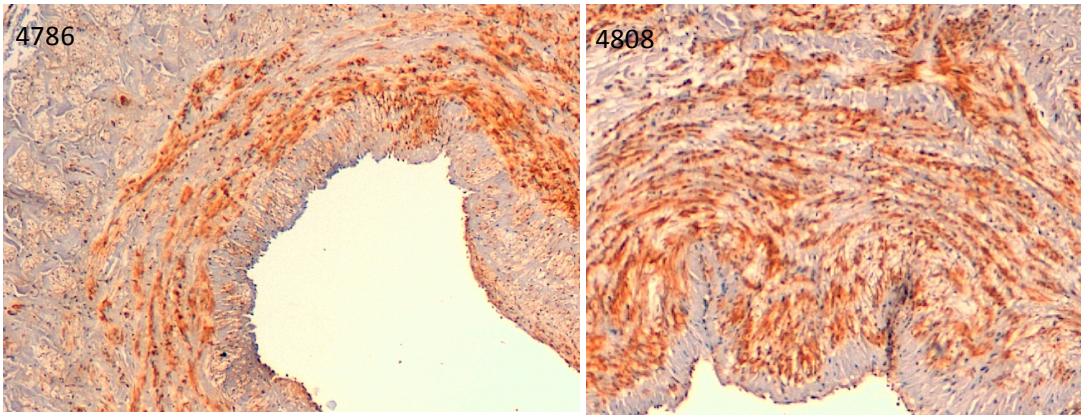

Figura 81. Inmunotinción con anti-Ki67 de venas insuficientes competentes

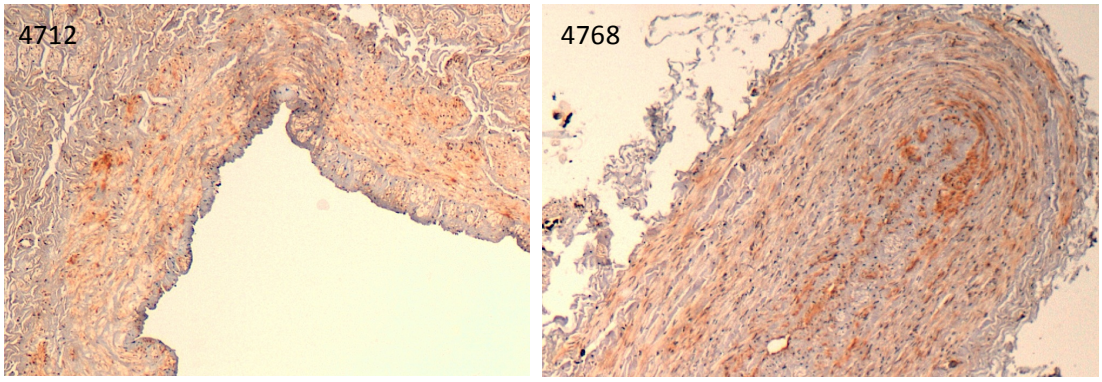

Figura 82. Inmunotinción con anti-Ki67 de venas insuficientes incompetentes

La cuantificación de este marcador mediante el método de cortes de color confirma la diferencia observada entre las muestras estudiadas de venas insuficientes competentes e incompetentes, resultando una proporción de marcador de 3.77%, 5.59%, 0.37% y 1.13% para las muestras 4786, 4808, 4712 y 4768, respectivamente. El reducido número de muestras analizadas no proporciona resultados suficientemente fiables y no permite concluir nada definitivo, tan sólo tendría carácter exploratorio, planteando la necesidad de abordar el análisis, en un futuro, más profundamente.

La inmunodetección mediante el anticuerpo CD68 permite determinar la existencia de neutrófilos en la pared venosa. La presencia de neutrófilos en la inmunotinción es reflejada mediante color marrón intenso.

La figura 83 muestra el resultado de la inmunotinción con anti-CD68 de la pared venosa de dos muestras control, donde se observa algún marcaje en la zona de la luz en el endotelio luminal, además de en relación con los vasa vasorum cuando éstos se localizan en adventicia o cuando se extienden hasta la capa media.

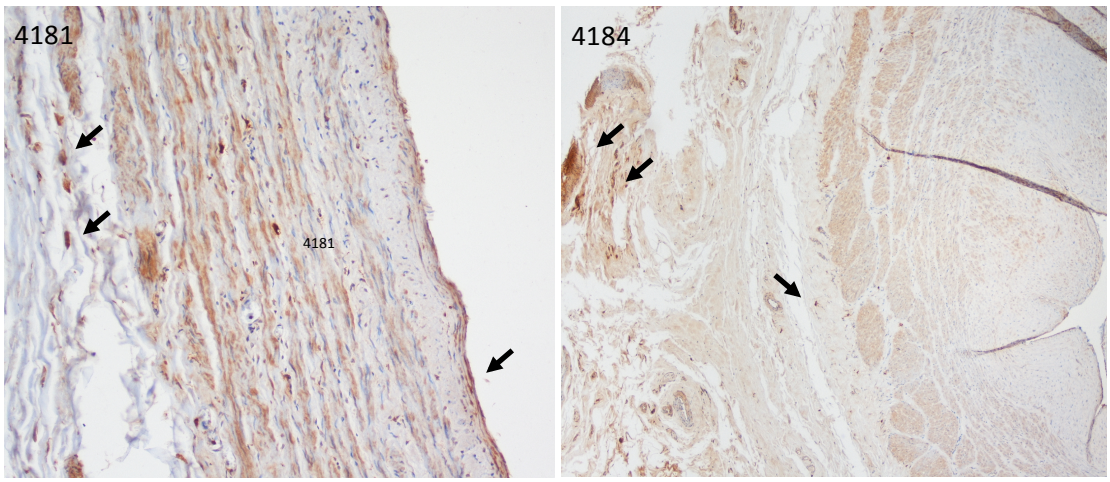

Figura 83. Inmunotinción con anti-CD68 de la pared de vena control (zonas positivas señaladas mediante puntas de flecha)

En las venas insuficientes competentes (figura 84), el marcaje con anti-CD68 fue similar al caso de las venas controles. Se apreció marcaje en el borde luminal, en vasos de la adventicia y muy ligero en la capa media, en relación con los vasa-vasorum.

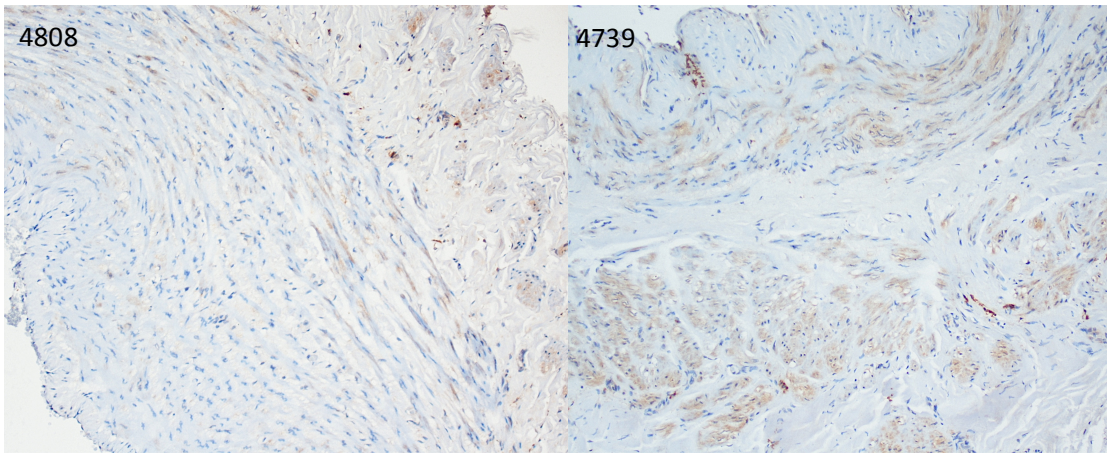

Figura 84. Inmunotinción con anti-CD68 de venas insuficientes competentes

En las venas insuficientes incompetentes (figura 85) se observó marcaje fundamentalmente a nivel de la adventicia, también algo en la capa media y en el borde luminal.

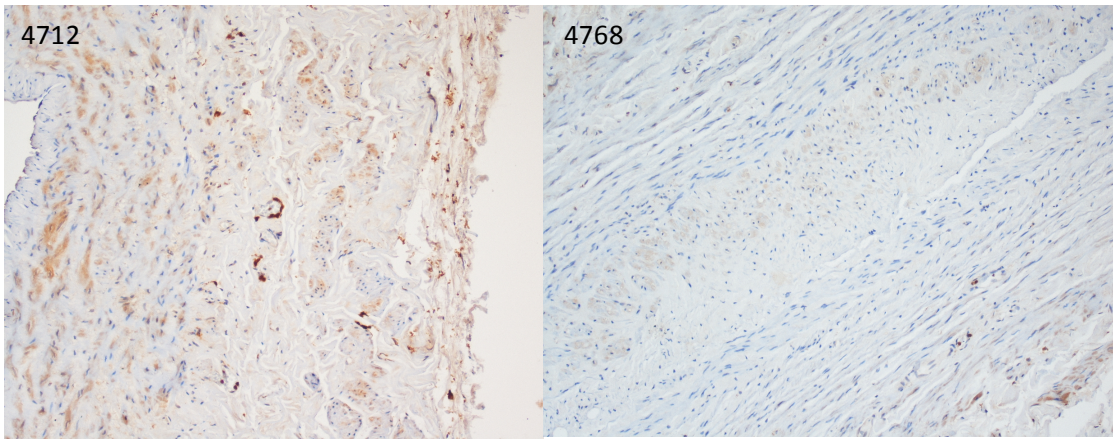

Figura 85. Inmunotinción con anti-CD68 de venas insuficientes incompetentes

La cuantificación del marcador del antígeno CD68 muestra valores muy similares entre las muestras analizadas, tanto de venas control como de venas insuficientes competentes e incompetentes, resultando en una proporción del marcador inferior al 1% del área de la pared en todos los casos, y donde cabe aplicar las mismas consideraciones, antes mencionadas, referentes a su carácter exploratorio y no concluyente.

La inmunodetección del VEGF de las muestras control de los segmentos estudiados mostraron marcaje con el anticuerpo en el endotelio luminal de la vena y en los

microvasos de la adventicia, siendo el marcaje en el resto de la pared imperceptible (figura 86).

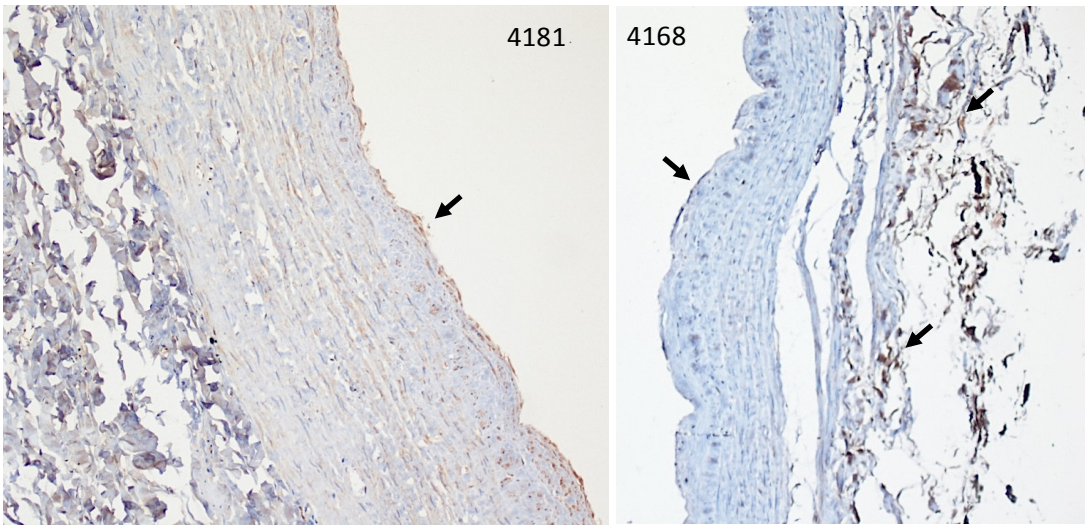

Figura 86. Inmunotinción con anti-VEGF de la pared de vena control (zonas positivas señaladas mediante puntas de flecha)

En las venas insuficientes competentes pudo observarse marcaje en la capa media además de en el endotelio luminal y en la adventicia (figura 87). En las venas incompetentes (figura 88) no se observó apenas marcaje en la pared de la vena, apreciándose ligeramente en algunos casos en zonas del endotelio luminal y en la adventicia.

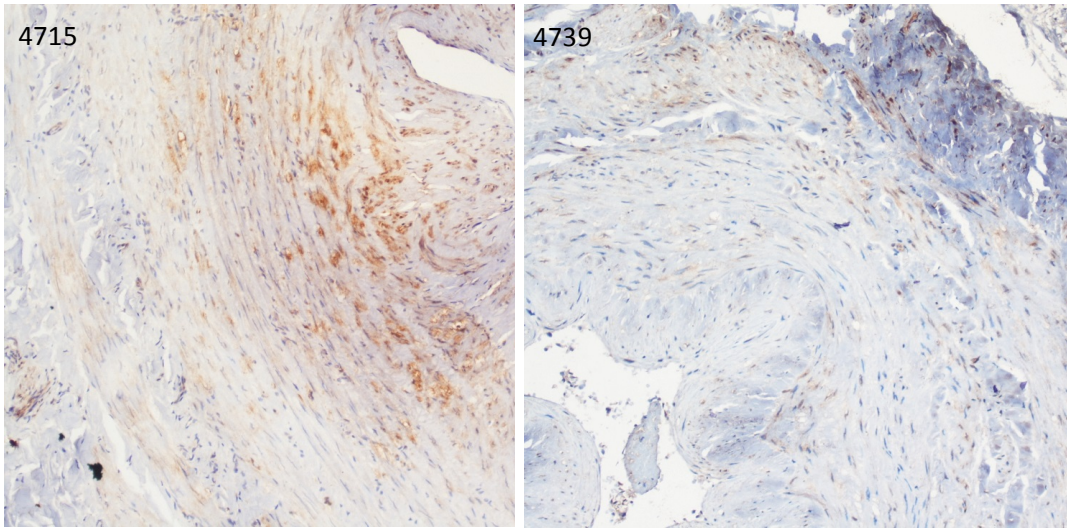

Figura 87. Inmunotinción con anti-VEGF de venas insuficientes competentes

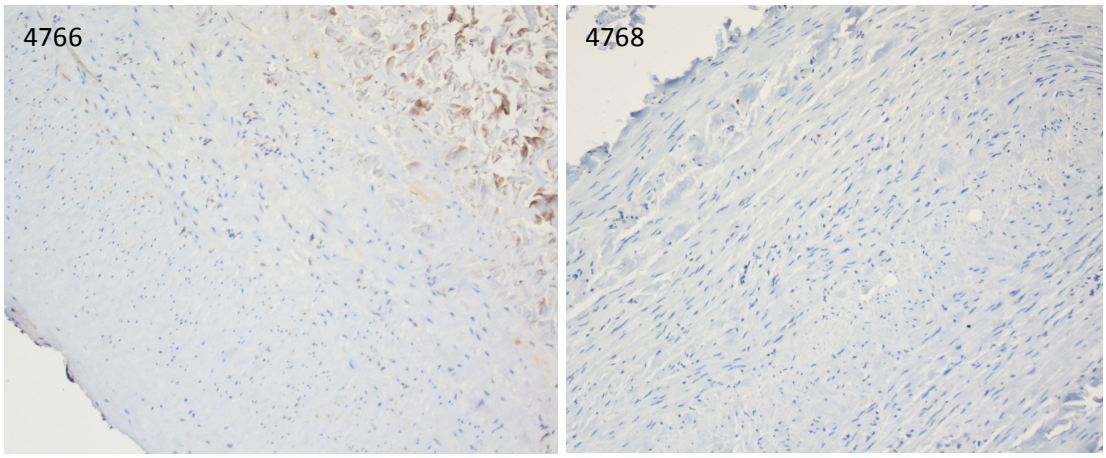

Figura 88. Inmunotinción con anti-VEGF de venas insuficientes incompetentes

La cuantificación del marcador del antígeno anti-VEGF determina una proporción de 0.39% y 0.18% para las muestras control 4181 y 4168 respectivamente (figura 86). Para las muestras de segmentos insuficientes competentes, la proporción es superior con valores de 0.4% y 1.77% para las muestras 4715 y 4739 respectivamente (figura 87). El marcaje positivo de VEGF en zonas de la adventicia hace que el valor medido también dependa de la extensión y estado de esta capa en la muestra analizada. Esta es la razón del escaso valor medido para la muestra 4715 que no presenta prácticamente capa adventicia. La proporción de VEGF en la muestra incompetente 4766 es 0.54%, no midiendo valor alguno en el caso de la muestra 4768 (figura 88).

5.3.2. Análisis de las fibras elásticas de la pared venosa insuficiente

Con la tinción modificada de Van Gieson se observa una mayor concentración de fibras elásticas en la capa adventicia que en el resto de capas de la pared de la vena. La lámina elástica interna aparece dañada o desaparecida en algunas zonas (figuras 89.a y 89.b). Las fibras elásticas muestran además un patrón más desorganizado e irregular (figuras 89.b y 89.c), con una distribución muy dispersa en capas media e íntima.

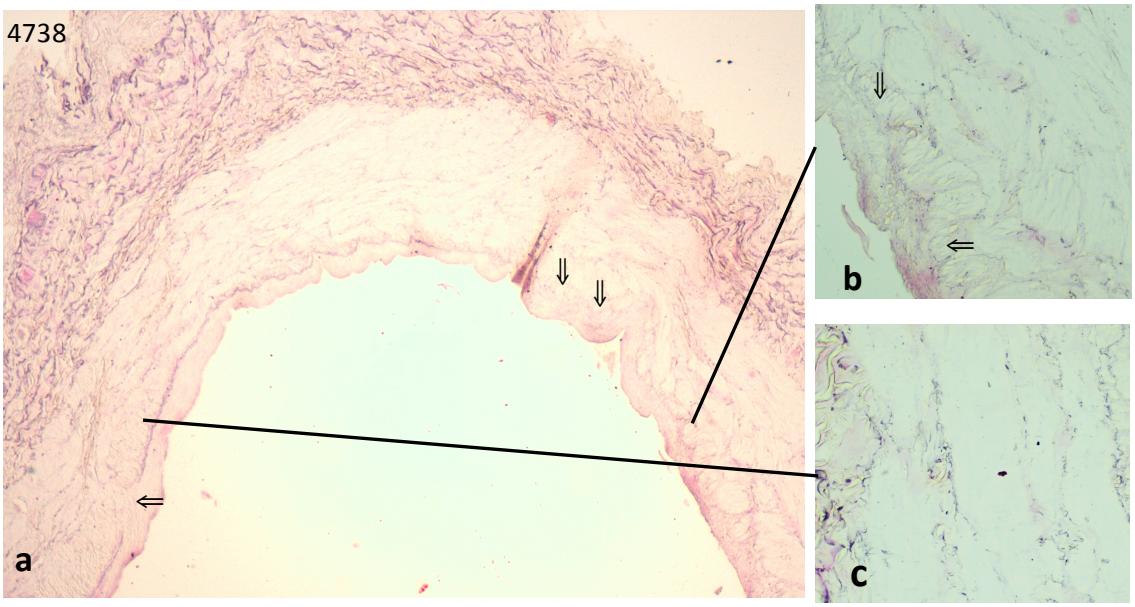

Figura 89. Distribución de fibras elásticas en venas insuficientes, con daños en la lámina elástica interna (señalados con el símbolo ⇓)

La presencia de elastina fue determinada utilizando el anticuerpo antielastina, que marca elastina inmadura o restos de fibras elásticas, esto es, células que estén formando fibras elásticas o zonas de destrucción de fibras elásticas.

La figura 90 muestra el resultado de la inmunotinción con antielastina de la pared venosa de una muestras control, reflejando un moderado marcaje en la capa media de la pared.

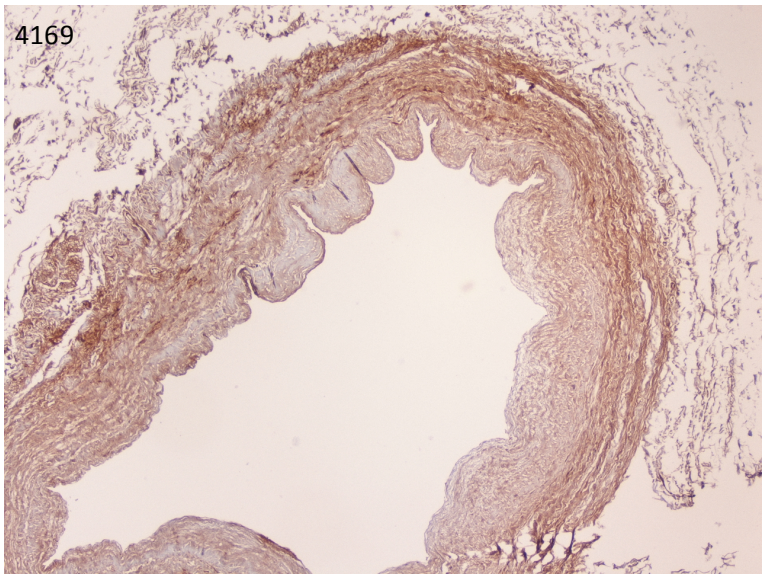

Figura 90. Inmunotinción con antielastina de la pared de vena control

La presencia de marcaje de la elastina en las venas insuficientes competentes es muy escaso (figura 91).

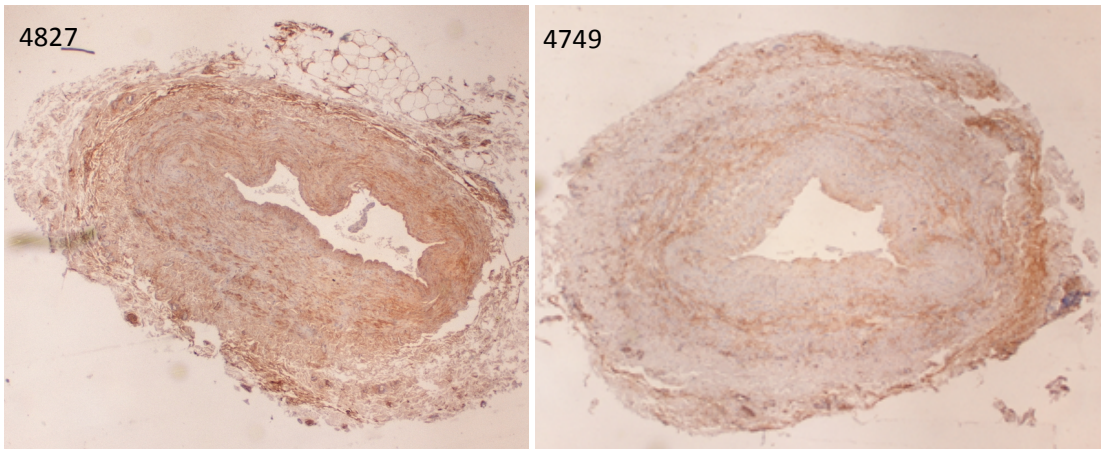

Figura 91. Inmunotinción con antielastina de venas insuficientes competentes

La figura 92 corresponde a inmunotinción con antielastina de la pared venosa de muestras incompetentes, donde es posible apreciar zonas positivas de marcaje con el anticuerpo en la capa media.

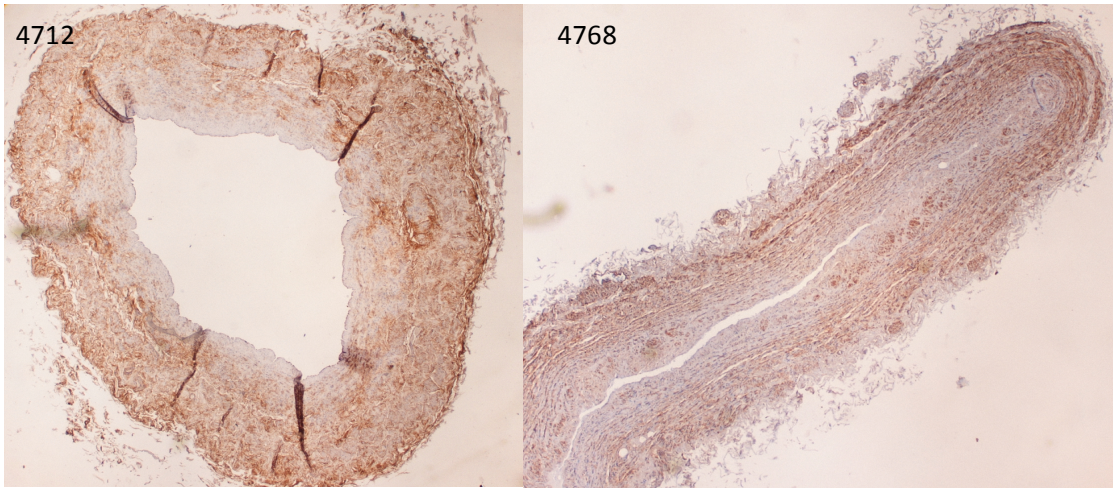

Figura 92. Inmunotinción con antielastina de venas insuficientes incompetentes

La cuantificación del marcador antielastina resulta en una proporción de marcaje de 9.16% para la muestra control número 4169 mostrada en la figura 90, mientras que para las muestras insuficientes es menor, siendo 8.93% y 5.23% para las muestras competentes números 4827 y 4749 de la figura 91, y 5.99% y 8.5% para las muestras incompetentes números 4712 y 4768 de la figura 92.

6. DISCUSIÓN

La enfermedad venosa crónica primaria es una enfermedad ampliamente extendida, afectando alrededor del 10-40% de las personas entre 30 y 70 años de edad [Evans et al. 1999]. Es una enfermedad con una alta incidencia poblacional y ya desde sus estadios clínicos iniciales ocasiona un deterioro en la calidad de vida de los pacientes [Ortega-Santana et al. 2014], así como la necesidad de intervenciones quirúrgicas y un gran número de consultas en atención primaria y especializada [Bellmunt et al. 2013].

El sistema venoso de los miembros inferiores está dividido en 3 componentes: sistema venoso profundo, sistema venoso superficial y sistema de venas perforantes. Estos componentes están interconectados, de tal modo que la disfunción de uno de ellos conduce, generalmente, a la disfunción de los otros y al posterior desarrollo de insuficiencia venosa [Somers et al. 2006].

La etiología de la insuficiencia venosa es controvertida e inicialmente se consideró como una manifestación secundaria de la incompetencia valvular y de la exposición de la pared venosa a altas presiones hidrostáticas, como las generadas desde la aurícula derecha estando el sujeto en pie [Elsharawy et al. 2007].

Durante mucho tiempo se ha intentado determinar la causa, o las causas, que provocan el desarrollo de la insuficiencia venosa. Se conocen múltiples factores predisponentes pero no se sabe a ciencia cierta si primero se produce el deterioro de la pared venosa o es el reflujo, y los cambios asociados al mismo tales como la turbulencia del flujo sanguíneo o el aumento de la presión ejercida sobre la pared, quien provoca el desarrollo de la enfermedad. Recientemente se ha demostrado el desarrollo de venas insuficientes en ausencia de incompetencia valvular y, por ello, hoy se acepta que es la alteración primaria de los elementos estructurales de la pared venosa la que conduce a la incompetencia valvular al provocar su debilidad y posterior dilatación [Somers et al. 2006; Elsharawy et al. 2007]. Esta opinión se apoya, entre otros, en los trabajos que comparan segmentos de vena sometida a reflujo (incompetentes) con segmentos de venas no sometidas a reflujo (competentes) (ver tabla 26).

En general los estudios señalados centraron su análisis sobre algún componente de la pared, como el colágeno o las fibras elásticas, y sólo Svejcar et al. (1963) y Elsharawy et al. (2007) realizaron un análisis más global de los componentes, aunque este último no contempla el papel de algún componente en la totalidad de la pared (por ejemplo, la cuantificación de CML se limita a sólo la capa media, y la cuantificación de fibras elásticas se realiza únicamente en el área de la lámina elástica interna). Además, y teniendo en cuenta las particularidades de cada uno de ellos, es necesario poner de manifiesto que sus resultados no son similares, y que, en ocasiones, son diametralmente opuestos. Esta disparidad entre los resultados de alguno de dichos trabajos, como los de Svejcar et al. y Elsharawy et al., cabe achacarla a las diferentes metodologías empleadas, propias de las épocas tan dispares en las que se llevaron a cabo los estudios, entre las que cabe mencionar al método de cuantificación o al de evaluación de la insuficiencia de los segmentos estudiados, entre otros.

En tal sentido, un análisis rápido de las conclusiones de dichos estudios pone de manifiesto que mientras algunos autores han observado una reducción en el contenido de colágeno y de elastina en las venas de pacientes con enfermedad venosa primaria al compararlas con venas normales [Andreotti et al. 1979; Peña et al. 2004], otros, por el contrario, objetivan un aumento en el contenido de colágeno acompañado sin cambios en el contenido de elastina [Travers et al. 1996] o una reducción de ésta en los segmentos insuficientes respecto a los segmentos controles [Gandhi et al. 1993; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007]. Incluso se ha demostrado que no se modifica el contenido de colágeno mientras que sí existe una reducción en el contenido de elastina en las venas insuficientes en comparación con las venas normales [Venturi et al. 1996].

En cuanto al estudio de las células musculares lisas también existen estudios contradictorios pues mientras unos informan de hipertrofia muscular [Khan et al. 2000], otros hablan de la pérdida de CML y su sustitución por tejido fibroso [Rose et al. 1986; Wali et al. 2003] y otros no detectan ninguna alteración [Kockx et al. 1998].

Muy pocos de esos estudios comparan la estructura de la pared de las venas insuficientes en función de que los segmentos estudiados presenten, o no, reflujo; es decir se traten de segmentos incompetentes o competentes. Pero, además, la metodología empleada para determinar si en realidad esos segmentos cumplen clínicamente con el requisito expuesto es variable y, al mismo tiempo, dudosa en ocasiones. Así, mientras Gandhi et al. (1993), Venturi et al. (1996) y Elsharawy et al. (2007) seleccionaron a los pacientes de los que extrajeron las muestras mediante ecografía doppler, discriminando entre los que presentaban un reflujo patológico y los que no, otros investigadores determinaron la competencia o incompetencia de las muestras incluidas en sus estudios atendiendo exclusivamente al aspecto macroscópico de las mismas clasificando como venas insuficientes a aquellas que se mostraban dilatadas y como venas normales a las que presentaban un diámetro uniforme y cercano a la normalidad [Svejcar et al. 1963; Maurel et al. 1990; Chello et al. 1994; García et al. 1999]. Hoy en día se acepta de manera universal que el "gold standard" para el estudio de la presencia de reflujo venoso es la ecografía doppler puesto que otros métodos dan muchos falsos positivos. Sin embargo hay que tener en cuenta que en la época en la que se realizaron algunos de esos trabajos aún no se había extendido el uso de dicha técnica lo cual no significa, bajo nuestro punto de vista, que sus conclusiones no puedan ser totalmente válidas sino que puede ser necesaria una revisión de las mismas teniendo en cuenta las características hemodinámicas reales de las muestras estudiadas.

Nosotros entendemos que la única manera de comprobar si la vena de los sujetos con insuficiencia venosa ya presenta alteraciones antes de que se haga patente la existencia de reflujo sería mediante la comparación por pares de segmentos pertenecientes a sujetos diagnosticados de insuficiencia venosa, enfrentando segmentos en los que, mediante el uso de la ecografía doppler, se hubiera demostrado la presencia de un flujo retrógrado con segmentos en los que, de igual manera, se haya apreciado que las características morfológicas (tamaño y regularidad del diámetro) y hemodinámicas de la vena fueran normales.

En la tabla 26 se muestran de manera muy resumida las principales características de las muestras analizadas por los distintos autores consultados. Se indican el tamaño de la muestra y la procedencia de los segmentos venosos estudiados (controles, incompetentes, competentes) y las principales conclusiones obtenidas en cuanto a la manera en la que se alteran los elementos estructurales de la pared de las venas con insuficiencia venosa primaria. Ninguno de esos trabajos cumple el requisito metodológico que acabamos de exponer por lo que las conclusiones a las que lleguemos a lo largo de esta tesis no podrán ser comparadas de manera totalmente objetiva con la de ninguno de los autores consultados puesto que, cuando hablan de las alteraciones en segmentos competentes o incompetentes, realmente están comparando segmentos procedentes de sujetos distintos y, por tanto, aunque es la conclusión que consideran válida, sus resultados no hablan de la evolución que sucede en cada paciente. Más adelante insistiremos en ello.

Por ello nuestro objetivo general ha sido estudiar, aunque sea de manera muy básica, los cambios presentes en la estructura de la pared de segmentos competentes e incompetentes obtenidos de venas safenas internas en las que se ha demostrado mediante eco-Doppler la existencia de reflujo, total o parcial, los cambios que suceden en su matriz extracelular (centrados en los cambios en el colágeno y las fibras elásticas), y en las fibras musculares, además de compararlos con segmentos venosos normales. El haber alcanzado resultados concluyentes nos permite poner en marcha estudios más ambiciosos, conducentes a conocer cómo se muestran todos los cambios ya conocidos en la bibliografía cuando comparamos muestras pertenecientes a un mismo sujeto.

Para ello planteamos un estudio analítico observacional de casos y controles, al igual que la mayoría de estudios previos realizados y publicados en la literatura especializada. El número de sujetos que abarca este trabajo se encuentra dentro del rango empleado en otros estudios (tabla 26). En total se obtuvieron un total de 75 segmentos venosos de características hemodinámicas y procedencia anatómica distinta pertenecientes a 46 sujetos de los cuales 38 eran pacientes con insuficiencia venosa con edad media de 48 ± 13.2 años y 8 eran cadáveres con una edad media de 32 ± 21 años.

Con el fin de garantizar una mayor independencia a la hora del análisis de las muestras, como regla general se estudió un solo cristal por cada segmento venoso y por cada una de las técnicas empleadas descartando, para el presente estudio, los cortes en los que aparecía una válvula venosa pues, como sabemos, a su nivel la estructura de la pared es diferente al del resto de la vena.

En general, muchos de los estudios histológicos, histopatológicos o morfométricos, y los de la pared venosa no son una excepción, se basan en la comparación de muestras con la intención de identificar los rasgos diferenciales de cada una de ellas mediante el empleo de métodos de observación y medida muy variables. Así, mientras algunos de los estudios consultados en este trabajo (tabla 26) utilizaron exclusivamente la observación mediante microscopio óptico o electrónico, de carácter exploratorio y buscando la mera comprensión del fenómeno [Rose et al. 1986; Mashiah et al. 1991;

Khan et al. 2000; Wali et al. 2003], otros complementan la observación microscópica con la cuantificación de algunos parámetros usando oculares con escala micrométrica para la medida de distancias [Porto et al. 1995], técnicas estereológicas para la medida de longitudes, áreas y volúmenes [Travers et al. 1996; Kockx et al. 1998] o métodos semicuantitativos utilizando escalas ordinales [Kockx et al. 1998; García et al. 1999]. Tampoco podemos olvidar que, hasta no hace mucho, la cuantificación de los diferentes elementos de la pared vascular sólo se podía hacer mediante métodos bioquímicos, mientras que las modificaciones morfológicas quedaban sujetas a la interpretación subjetiva de los observadores de las muestras. Entre dichas técnicas empleadas tenemos a las colorimétricas de cuantificación de marcadores bioquímicos como la hidroxiprolina para el contenido de colágeno [Svejcar et al. 1963; Andreotti et al. 1979; Chello et al. 1994; Venturi et al. 1996] o la cromatografía líquida de alta eficacia para determinar el contenido de elastina midiendo el nivel de desmosina e isodesmosina [Chello et al. 1994; Venturi et al. 1996], etc.

El desarrollo de las capacidades de los ordenadores personales ha permitido el uso generalizado de herramientas informáticas que posibilitan almacenar gran cantidad de imágenes obtenidas mediante microscopía para ser tratadas y medidas posteriormente. Por ello cada vez son más numerosos los estudios que, en muchas ramas de la biología y de la medicina, hacen uso de ellos. Sin embargo, a nuestro conocimiento, su aplicación en el análisis de la pared venosa insuficiente es muy escaso y la metodología empleada no ha sido suficientemente aclarada por los autores.

Las técnicas que hacen uso de imágenes digitales han sido utilizadas en algunos estudios recientes, como el realizado por Elsharawy et al. quienes emplean un analizador de imágenes denominado *Super-Eye* mediante el que midieron los grosores de las capas de la vena, así como los porcentajes de ocupación de las fibras de colágeno, fibras musculares y fibras elásticas [Elsharawy et al. 2007], o el estudio realizado por Velasco-Martin et al. quienes realizan la cuantificación morfométrica de la actina y las fibras elásticas mediante el programa de procesamiento de imágenes *ImageJ* [Velasco-Martin et al. 2013]. Sin embargo en estas publicaciones no se detallan los métodos de tratamiento y análisis de imágenes empleados y tampoco ha sido posible obtenerlos contactando directamente con algunos de sus autores.

La reciente utilización de estos programas en los estudios morfométricos no ha permitido consensuar todavía, entre la comunidad investigadora, la mínima información necesaria en relación al material y los métodos empleados. Esta debería ser indicada junto con los resultados alcanzados al objeto de permitir su comparación con los de otros estudios, permitiendo, además, garantizar la reproducibilidad de los procedimientos de cuantificación y medidas obtenidas. Básicamente se trata de abogar por exponer con detalle los métodos de cuantificación basados en técnicas de procesamiento y análisis digital de imágenes, de manera similar a lo habitual en muchos otros campos científicos en los que se especifica el procedimiento de preparación histológica de las muestras, de extracción, caracterización, purificación y cuantificación de diferentes marcadores, etc.

Para la cuantificación de las medidas de interés en este trabajo se han empleado herramientas software. Para la medición de longitudes y áreas se han empleado las opciones facilitadas por el microscopio, que también permite la captura de la imagen de la muestra y su almacenamiento en formato digital. Para la cuantificación del contenido de fibras musculares, matriz extracelular y fibras elásticas en las muestras se utilizaron técnicas de procesamiento digital y análisis de las imágenes previamente capturadas. Estas técnicas cuentan con la ventaja de ser más sencillas, menos costosas, ser reproducibles, no destructivas del tejido de la muestra, y no verse afectadas por la inter e intravariabilidad de diferentes observadores.

En el estudio histológico de las imágenes de nuestro estudio se consideraron varios métodos de segmentación. Tras valorar las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, finalmente se seleccionaron dos métodos de segmentación de imágenes para el estudio histoquímico: los basados en el valor umbral y en el agrupamiento de píxeles por el color. Aunque ambos métodos han sido utilizados en otras áreas de la medicina, no se han encontrado referencias bibliográficas de su uso específico en el estudio de la pared venosa.

El programa de procesamiento de imágenes utilizado ha sido *Matlab*, sobre el que se han desarrollado pequeños scripts de comandos que realizan las tareas requeridas sobre las imágenes digitales para la cuantificación de las variables de interés en cada caso, proporcionando los resultados en el formato adecuado (numérico e imágenes).

En la elección del método estadístico inferencial se ha tenido en consideración que no tenemos la certeza de que las distribuciones de las variables en estudio de las venas (grosor de las capas íntima y media, proporciones de los diferentes componentes de la pared) sigan una distribución normal. Por otra parte, el pequeño número de muestras existentes en algunos de los grupos de segmentos resulta insuficiente para la aplicación de pruebas de verificación de ajuste a la distribución normal (disminuye la potencia del test estadístico impidiendo la detección de pequeñas diferencias o defectos y, por consiguiente, aumenta el error tipo II), mostrando una tendencia a aceptar la hipótesis nula de normalidad de la distribución, incluso cuando los datos no muestren gráficamente dicho comportamiento [Pett 1997].

Los test estadísticos no paramétricos de inferencia estadística no imponen la condición de normalidad de la distribución de la población sobre la que las muestras fueron extraídas, pero tienen sus propios requisitos para la correcta interpretación y validez de los resultados obtenidos a través de ellos. Cuando se trata de comparar 2 o más grupos usando test no paramétricos se requiere, entre otros, que la distribución de los valores dentro de cada grupo sea similar en cuanto a la forma de la distribución, aunque no se requiere una forma determinada [Pett 1997].

Una revisión de los estudios publicados en el ámbito que nos ocupa (tabla 26) muestra que se utilizan tanto métodos estadísticos paramétricos como no paramétricos obviando el análisis de los requisitos necesarios, y por tanto sin considerar la adecuación o no de los mismos.

En nuestro caso el tamaño muestral total está acorde con el de otros autores y al introducir variables tales como el nivel anatómico del que se extrajo la muestra, la presencia o no de reflujo, la condición de sujeto control o patológico o combinación de ellos, encontramos que los grupos resultantes son muchos menores (reproducimos la tabla 5 a modo de ejemplo).

Tabla 5. Desglose de muestras seleccionadas según procedencia y tipo de 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**

Considerando el reducido tamaño de los diferentes subgrupos de muestras, y tras observar gráficamente que muchas de las distribuciones muestrales a comparar tienen formas dispares, se optó por utilizar técnicas estadísticas de remuestreo, que constituyen una alternativa factible a los métodos tradicionales, dada la mayor disponibilidad de cómputo de los ordenadores actuales.

Aunque conceptualmente las técnicas de remuestreo son más generales en su formulación y más fáciles de comprender que las técnicas clásicas, su utilización requiere, en la mayoría de los casos, de la creación de pequeños programas de ordenador que implementen las técnicas en el contexto de nuestro problema o de la utilización de programas que ya implementen internamente estas técnicas [Good 2005]. En este trabajo se ha escogido la primera de las opciones, lo que permite un mayor control y flexibilidad, y su adaptación a cualquier estadístico que se desee estudiar.

Los resultados de los trabajos disponibles en la literatura se exponen de manera muy hetereogénea: en ocasiones la extensión de un componente se expone como mm^2, en otras se acude al porcentaje del mismo, muy pocos estudios tienen en cuenta la existencia de reflujo, o no, en las muestras analizadas, a veces los resultados se proporcionan desagregados por capa de la vena o los resultados provienen de estudios estadísticos con muestras pareadas entre región proximal y distal, etc. Todo ello, junto al, en nuestra opinión, inadecuado estudio estadístico al utilizar métodos paramétricos y no paramétricos no adaptados a los tamaños y distribución muestrales, impiden en gran medida su comparación con los aquí obtenidos. Sin embargo es obligado entrar en el análisis comparativo de los resultados para determinar hasta que punto el método que hemos aplicado aporta resultados coincidentes con lo ya expuesto por otros autores y donde fuera necesario analizarlos con mayor profundidad.

En relación al ***análisis del grosor*** de las capas de la pared venosa sólo consideramos a las capas íntima y media, excluyendo la adventicia puesto que no estábamos seguros de disponer de toda su extensión debido a los posibles daños producidos en el proceso de extracción de la vena. El análisis se realizó considerando las distintas procedencias

anatómicas de los segmentos, y también en función de las características hemodinámicas de los mismos.

Nuestro trabajo confirma que la íntima de las venas procedentes de pacientes con insuficiencia venosa sufre alteraciones en su grosor y que dicho engrosamiento puede ser uniforme o irregular, alternando zonas de mayor con otras de menor grosor en la misma muestra, lo que confirman los hallazgos de estudios previos que observan una superficie intimal con afectación parcheada con áreas hipertróficas y atróficas [Khan et al. 2000; Wali et al. 2002[a]; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007]. En la mayoría de los segmentos competentes se observó un engrosamiento uniforme de toda la capa, a diferencia de los observado en los segmentos incompetentes, en los cuales se apreciaban las irregularidades descritas.

Al observar estas irregularidades de la capa íntima en las muestras de segmentos incompetentes, se decidió el estudio por separado de las áreas hipertróficas y atróficas de la capa íntima, tomando medidas de grosor representativas de ambas zonas, dado que el análisis a través de su promedio podría esconder las irregularidades observadas.

Cuando se tiene en cuenta la procedencia anatómica del segmento (cayado, muslo y pierna) y sus características hemodinámicas (control, insuficiente competente e insuficiente incompetente), el análisis estadístico revela que no existen diferencias significativas. Estos resultados confirman los encontrados por Travers et al. quienes no detectaron diferencias significativas ni en el grosor de la capa íntima, ni en el de la capa media, ni en el grosor de toda la pared al estudiar muestras extraídas de dos zonas anatómicas: proximales, de la unión safenofemoral, y distales, a nivel de rodilla [Travers et al. 1996].

Sin embargo, mientras los valores medios de la capa media que hemos encontrado se encuentran en rangos parecidos a los hallados por Travers et al., no sucede lo mismo con los valores apreciados en la capa íntima. Este hecho puede estar motivado por la diferente metodología utilizada en ambos estudios; mientras que Travers et al. obtuvieron el grosor medio de toda la capa, nosotros medimos por separado las áreas hipertróficas y las atróficas y, además consideramos de manera independientemente tanto las características hemodinámicas como el sector anatómico del que fueron extraídas.

Ello nos ha permitido apreciar que, en relación a los casos control, los segmentos venosos hemodinámicamente competentes de pacientes con insuficiencia venosa demostrada a otros niveles de la vena safena interna, presentan un aumento de su grosor que alcanza niveles de significación estadística.

Por otra parte, la medida independiente de las zonas con escaso grosor y las que lo tienen aumentado en la íntima venosa permite afirmar que el grosor de la zona de atrofia intimal de los segmentos incompetentes es inferior al grosor de la íntima de los segmentos competentes, y que el grosor de la zona de hipertrofia intimal de los segmentos incompetentes es mayor al grosor de la íntima de los segmentos competentes, siendo ambas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo no se aprecian

diferencias estadísticamente significativas al comparar el grosor de la capa media de los segmentos insuficientes competentes e incompetentes, aunque hay que señalar que dicha medida es menor en los segmentos incompetentes. La comparación entre los segmentos control y los segmentos incompetentes revelan diferencias entre los grosores de las capas en estudio. Las diferencias en la capa íntima son estadísticamente significativas.

El aspecto parcheado de la pared venosa incompetente, con áreas de la capa íntima hipertróficas y atróficas, ya ha sido puesto de manifiesto por diferentes autores y está justificado por el aumento de contenido de matriz extracelular [Rose et al. 1986; Maurel et al. 1990; Gandhi et al. 1993; Chello et al. 1994; Porto et al. 1995; Travers et al. 1996; García et al. 1999; Khan et al. 2000; Sansilvestri-Morel et al. 2001; Wali et al. 2002[b]], y por el desplazamiento de CML desde la capa media a la íntima [Sarmiento Ramos 1994; Wali et al. 2002[a]], situaciones que se interpretan como un mecanismo de compensación al estasis venoso.

Sin embargo el origen exacto del engrosamiento de la capa íntima es controvertido habiéndose sugerido, entre otros, que cualquier circunstancia que cause hipoxia en las células endoteliales provocará cambios de la pared venosa que comienzan en la íntima y que progresan a través de la pared [Wali et al. 2003].

También se ha demostrado la asociación entre la insuficiencia venosa y ciertos cambios en la capa íntima tales como la degeneración y la descamación de las células endoteliales [Wali et al. 2002[a]; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007] o la ruptura y desintegración de la capa elástica interna [Khan et al. 2000; Wali et al. 2002[b]]. En este sentido, algunos estudios han demostrado que la hipertensión venosa mantenida, provocada de manera experimental en la vena femoral de ratas provoca una respuesta precoz consistente en una migración de células musculares lisas desde la capa media hacia el subendotelio y un aumento de la matriz extracelular a expensas de la producción de colágeno y elastina, lo que se interpretó como los primeros pasos en la formación de una neoíntima o hiperplasia intimal [Sarmiento Ramos 1994]. Esta misma circunstancia se produce cuando se lesiona el endotelio aórtico, lo que produce la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas que induce los cambios señalados. Dicho efecto también podría producirse en las venas [Milroy et al. 1989].

Es evidente, por tanto, que la alteración endotelial provoca el aumento de grosor de la íntima pero el hecho de que, tal como hemos demostrado, dicho engrosamiento ya esté presente en aquellas partes de la vena que aún no está sometida a hipertensión venosa ni a flujos turbulentos, nos hace pensar que son otros factores, presentes antes de la instauración de la insuficiencia venosa, los que son capaces de inducir cambios en la pared. Esto no tiene que entenderse, necesariamente, en el sentido de un apoyo explícito a la teoría de que la lesión primaria de la insuficiencia venosa radica en la pared, algo que pudiera ser perfectamente posible, sino que los sujetos que sufren insuficiencia venosa poseen ciertos factores, no definidos, que ya provocan esos cambios y que son independientes de las condiciones hemodinámicas. Esta premisa abre la puerta a plantearnos varias preguntas algunas de las cuales pueden ser: si no están mediados los cambios por el efecto directo o indirecto de la incompetencia venosa,

¿cuándo comienzan a aparecer los cambios? Siendo la edad uno de los factores epidemiológicos y de riesgo contrastados en la bibliografía al uso, ¿podría tratarse, simplemente, de un proceso de envejecimiento acelerado de la pared venosa?

Pero, aún mas; el hecho, también demostrado por nosotros en el presente trabajo, de que el comportamiento de la íntima venosa sea diferente en los sectores de la vena con y sin reflujo demostrado procedente de los mismos pacientes (aspecto parcheado en el que alternan áreas atróficas -incluso con respecto a las venas controles- junto a otras con gran desarrollo intimal) nos permite plantear si la existencia de reflujo agrava las alteraciones en la pared venosa, ya existentes sin presencia de reflujo, de tal manera que las diferentes formas de mostrarse la íntima de las venas en los pacientes con insuficiencia venosa no sólo podrían considerarse como diferentes etapas en la evolución crónica de la enfermedad, tal como refleja Travers et al. (1996), sino que podrían ser consecuencia del reflujo indicando que los cambios hemodinámicos influyen de manera determinante en la alteración de la estructura de la íntima. Sin embargo quedará para el futuro encontrar las causas que determinan ese comportamiento no homogéneo de la pared de la vena.

Aunque ya hemos mencionado que no conocemos ningún otro estudio en el que se hayan enfrentado muestras obtenidas de segmentos competentes e incompetentes pertenecientes a los mismos pacientes y que, por tanto, difícilmente podríamos contrastar nuestros hallazgos con los de otros autores, creemos necesario intentar, al menos, una aproximación con los mismos. En tal sentido, nuestros resultados no parecen coincidir con los de Mashiah et al., quienes, tras un análisis con microscopía electrónica de venas de pacientes con incompetencia de la unión safenofemoral, no observaron cambios en el grosor de las capas íntima o adventicia. Tan sólo objetivaron la presencia de áreas débiles en diferentes zonas a lo largo de la vena en la que existía un adelgazamiento de la capa muscular lo que sería la causa de la debilidad y las dilataciones longitudinales de la vena y, en consecuencia, la causa de las varices [Mashiah et al. 1991]. Sin embargo, el resto de autores, alguno de los cuales han tenido de alguna manera en cuenta el estado hemodinámico, aprecian un engrosamiento de la pared venosa [Porto et al. 1995; Travers et al. 1996; Khan et al. 2000; Wali et al. 2002ª; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007]. Creemos que esta divergencia puede atribuirse a que Mashiah et al. restringen el estudio a la zona valvular y sus proximidades, y a que el método de estudio empleado fue exclusivamente observacional frente a los procedimientos de cuantificación empleados por la mayoría de los otros autores.

Mención aparte merece un reciente estudio del año 2013 de Velasco-Martin et al. Estos autores distinguen entre lesiones iniciales y lesiones establecidas de la enfermedad venosa y consideran que el paso de un estadio a otro se trata de un proceso evolutivamente continuo. Según ellos, en las lesiones iniciales la capa íntima duplicaría su tamaño en comparación con la vena normal, presentando un aumento de la MEC y el depósito de fibras elásticas cortas e inmaduras, siendo su cantidad significativamente mayor que en venas normales. En lesiones establecidas en segmentos con reflujo demostrado a la exploración Doppler, encuentran una fibrosis irreversible con pérdida

de células musculares lisas en las capa íntima y media. Comparando este último estudio con nuestro trabajo, puede intuirse cierta semejanza tanto entre las lesiones encontradas en los segmentos competentes, a las que dichos autores denominan *lesiones iniciales*, como entre las que hemos encontrado en los segmentos incompetentes y las que ellos denominan *lesiones establecidas*. Sin embargo no podemos aventurar ni confirmar nada más puesto que esta publicación se ha realizado en modo póster [Velasco-Martin et al. 2003] y no existe información detallada ni de la metodología ni de los resultados encontrados.

Por su parte, nuestros resultados muestran que la capa media responde de forma similar a como lo hace la íntima, aumentando su grosor. Tanto los segmentos competentes como los incompetentes obtenidos de pacientes con insuficiencia venosa muestran un mayor grosor de la capa media y entre ambos no hay diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en relación a los segmentos controles, esta diferencia es significativa al compararlos con los segmentos obtenidos de regiones competentes.

Estos resultados son similares a los observados en otros estudios, como en los de Travers et al. (1996) y Wali et al. (2001), con la salvedad de que no distinguen entre los segmentos de vena que han estado sometidos a reflujo y los que no. De igual manera los resultados obtenidos por Elsharawy et al., presentados como las diferencias apreciadas entre segmentos insuficientes competentes e incompetentes, aunque no pertenecientes a los mismos sujetos, indican que la capa media de la venas insuficientes es significativamente más gruesa que la de los controles, no existiendo diferencias significativas entre los segmentos con y sin reflujo [Elsharawy et al. 2007].

De esta manera, nuestros resultados también ponen de manifiesto que, tanto en los segmentos insuficientes competentes como en los incompetentes, se presenta una mayor desviación del grosor de la capa media que las desviaciones calculadas en los segmentos pertenecientes al grupo control, lo que, bajo nuestro punto de vista, corrobora tanto el carácter evolutivo de la enfermedad venosa crónica como que las alteraciones de la pared venosa están presentes antes de que se produzca la alteración hemodinámica.

La realización de test de datos pareados sobre las muestras de segmentos competentes e incompetentes pertenecientes a un mismo paciente arroja resultados no totalmente coincidentes a los obtenidos con los test de muestras independientes. Las diferencias de grosor de la capa media entre los segmentos competentes e incompetentes de un mismo sujeto sí son significativas, mientras que las diferencias de grosor de la capa íntima se mantienen no significativas, debido probablemente a que el valor promedio del grosor de esta capa en los segmentos incompetentes esconde las irregularidades que pudieran estar presentes. Únicamente Elsharawy et al. (2007) realiza un análisis de los grosores de la capa íntima y media distinguiendo segmentos insuficientes competentes e incompetentes. Aunque los resultados del análisis de este autor no son objetivamente comparables con los nuestros dada las distintas metodologías empleadas, observamos que nuestros resultados son parcialmente coincidentes con los expuestos por Elsharawy

et al., quienes concluyen que las diferencias de grosor no son significativas, ni para la capa íntima ni para la capa media.

Tal y como se expuso en el capítulo de material y métodos, el ***análisis de las variaciones de las fibras musculares y de la matriz extracelular*** se realizó mediante el cálculo de sus proporciones, normalizando las medidas por la sección de la pared venosa existente en la imagen de la muestra. De esta forma es factible comparar cortes con diferente sección transversal, así como incluir la capa adventicia en el análisis, aunque no estuviera presente en toda su extensión debido a los posibles daños producidos en el proceso de extracción de la vena. El análisis se efectuó considerando las distintas procedencias anatómicas de los segmentos y también en función de las características hemodinámicas de los mismos.

Su cuantificación se llevó a cabo utilizando el algoritmo de agrupamiento *k-means* cuyos fundamentos de funcionamiento y bondades a la hora de seleccionar el componente elegido han sido explicados oportunamente, el cual permite identificar de forma automática los objetos de interés frente a otros métodos utilizados en recientes estudios [Elsharawy et al. 2007] que requieren la necesidad de realizar calibraciones de color.

Los resultados de nuestro estudio revelan que la matriz extracelular aumenta de manera similar en los segmentos venosos obtenidos de pacientes, independientemente de que estuvieran o no sometidos a reflujo, y que este aumento alcanza niveles de significación estadística al compararlo con los controles en ambos casos.

Estos resultados están en la línea de lo señalado por otros autores, quienes también encontraron mayor porcentaje de MEC/colágeno en venas insuficientes respecto a controles [Rose et al. 1986; Maurel et al. 1990; Gandhi et al. 1993; Chello et al. 1994; Porto et al. 1995; Travers et al. 1996; García et al. 1999; Sansilvestri-Morel et al. 2001; Wali et al. 2002[b]; Elsharawy et al. 2007], pero no coinciden con los de Svejcar et al. (1963), Niebes et al. (1977), Andreotti et al. (1979), Psaila et al. (1989) y Peña et al. (2004), quienes comunican una menor proporción de componente MEC/colágeno en los segmentos insuficientes respecto a controles, ni con los de Venturi et al. (1996) y Kockx et al. (1998), quienes no encuentran cambios en la proporción de MEC/colágeno en segmentos insuficientes con respecto a segmentos normales. De los estudios indicados, tan sólo Maurel et al. (1990), Gandhi et al. (1993), Chello et al. (1994), García et al. (1999) y Elsharawy et al. (2007) compararon los segmentos competentes e incompetentes de las venas insuficientes, encontrando resultados similares a nuestro estudio, con la única diferencia de que García et al. (1999) objetivó una cantidad de MEC significativamente mayor en los segmentos incompetentes que en los insuficientes competentes.

El incremento del porcentaje de MEC observado en los segmentos insuficientes respecto a controles es, en definitiva, una cantidad relativa al área de la pared venosa analizada, de manera que no podemos afirmar que aumente su cantidad absoluta. Sin embargo, si enlazamos este resultado con los comentados anteriormente de incremento del grosor de

la pared del segmento insuficiente con respecto a los controles, ello podría significar un mayor contenido absoluto de MEC, a falta de verificar que el aumento de grosor de la pared se traduce en un aumento del área de la pared. Al hilo de lo comentado, Travers et al. (1996) encontraron un aumento del área de la pared en las venas varicosas respecto a controles, de forma que parecería razonable especular que el área de la pared de nuestras venas también estaría incrementada, y que por tanto el incremento del porcentaje de MEC observado en nuestro análisis conllevaría un aumento de la cantidad total**.** Este resultado es obtenido en el estudio realizado por Travers et al., que miden una mayor cantidad absoluta de MEC en las venas varicosas que en controles [Travers et al. 1996].

Al seleccionar la componente de fibras musculares, encontramos que su porcentaje es significativamente menor en los segmentos pertenecientes a pacientes con insuficiencia venosa en relación a los controles, lo cual coincide con lo mantenido por algunos autores, como Travers et al. (1996), Krasinski et al. (1997), Wali et al. (2001), Wali et al. (2003) o Velasco-Martin et al. (2013), mientras que son contrarios a los de Svejcar et al. (1963), Khan et al. (2000) y Elsharawy et al. (2007), quienes detectan mayor cantidad de fibras musculares en venas insuficientes respecto a venas controles, aunque sin indicar niveles de significación estadística. Kockx et al. (1998), por su parte, no observa diferencias.

Cuando se comparan los segmentos competentes e incompetentes de un mismo paciente entre sí no se aprecian diferencias significativas en el porcentaje de fibras musculares, lo que coincide con los hallazgos de Svejcar et al. (1963) y Elsharawy et al. (2007), teniendo siempre en cuenta la salvedad expresada previamente de la no similitud en las características de las muestras utilizadas.

No obstante, cabe destacar que Travers et al. (1996) observa que la extensión ocupada por las fibras musculares, no la proporción, es significativamente mayor en las venas insuficientes que en las controles.

Las posibles explicaciones a los diferentes resultados que, en relación a la alteración de la matriz extracelular y de las CML en las venas varicosas se presentan, son múltiples y entre ellas pueden destacarse las siguientes:

Gandhi et al. señalan que la distinta procedencia de los segmentos control puede ser el origen de tal disparidad [Gandhi et al. 1993], pues mientras unos los extraen de cadáveres [Svejcar et al. 1963; Niebes et al. 1977; Maurel et al. 1990], otros lo hacen de donantes vivos, como de pacientes sometidos a by-pass coronario, o intervenidos por traumatismo con daños vasculares asociados [Rose et al. 1986; Gandhi et al. 1993; Elsharawy et al. 2007].

También hay que tener en cuenta que la procedencia anatómica del segmento venoso puede ser otro elemento que origine disparidad [Gandhi et al. 1993; Travers et al. 1996], pues mientras unos estudios indican el segmento anatómico del que fue obtenida la

muestra (infrapoplíteo o suprapoplíteo) [Andreotti et al. 1979], otros no la detallan [Maurel et al. 1990].

Otro de los aspectos a considerar tiene que ver con las técnicas de laboratorio empleadas para cuantificar los componentes individuales de los tejidos [Gandhi et al. 1993]. A este respecto pueden citarse varios puntos, tales como que el procesado histológico de las muestras afecta a las medidas morfométricas por lo que, aunque pueda presuponerse que afecta de igual manera a todas las muestras de un mismo estudio, hay que ser cauteloso cuando se contemplan distintos estudios [Porto et al. 1995]. También se ha llamado la atención acerca de que la utilización habitual de la hidroxiprolina como marcador de colágeno en los análisis bioquímicos tiene algunas limitaciones dado que otras proteínas como la elastina también contienen hidroxiprolina, lo que podría dar lugar a mediciones inexactas [Van Kuppevelt et al. 1995]. Travers et al. indican también que la práctica de expresar el contenido de proteína en relación con el peso del tejido seco, muy habitual en los primeros estudios publicados, puede ser engañosa si la masa absoluta de la pared venosa se modifica o altera, fenómeno conocido como "reference trap" [Travers et al. 1996].

También se ha llamado la atención sobre el hecho de que la matriz extracelular es un factor dependiente de la edad y del sexo, pues se ha documentado que con la edad varía el contenido de colágeno de los vasos sanguíneos, lo que podría explicar las discrepancias entre los resultados publicados [Sansilvestri-Morel et al. 2001; Elsharawy et al. 2007].

Otro aspecto fundamental es el hecho de que algunos de los trabajos en los que se comparan muestras de segmentos competentes e incompetentes, no explican adecuadamente si su evaluación se realizó mediante el empleo de métodos objetivos como, por ejemplo, la exploración mediante eco-Doppler o, ni tan siquiera, con Doppler continuo, aunque no sea éste un método ni objetivo ni fiable al 100%. Así, por poner algunos ejemplos, mientras en algunos casos la evaluación se realizó macroscópicamente mediante la simple inspección física [Svejcar et al. 1963; Maurel et al. 1990; Chello et al. 1994; Venturi et al. 1996], en otros estudios no se indica siquiera el método empleado para evidenciar la competencia e incompetencia del segmento insuficiente [Psaila et al. 1989; García et al. 1999]. Esta falta de método también es achacable a la obtención de las muestras procedentes de sujetos control pues en muchos de ellos se asume que la vena safena interna es hemodinámicamente normal por el solo hecho de que el sujeto no presenta varices, lo cual no puede afirmarse totalmente [Andreotti et al. 1979; Travers et al. 1996; Venturi et al. 1996; Khan et al. 2000; Wali et al. 2002[b]; Wali et al. 2003]. En este punto debemos manifestar que, estando totalmente de acuerdo con ello, es necesario admitir cierta laxitud en la aceptación de estos sujetos control puesto que, si bien es cierto que un cadáver donante que no presente varices pudiera ser portador de venas hemodinámicamente incompetentes, no es menos cierto que las venas extraídas de sujetos sometidos a cirugía aortocoronaria o a amputaciones por isquemias crónicas no son venas normales, tal como se ha puesto de manifiesto en algunos trabajos. En consecuencia sólo quedarían como sujetos controles estrictos

aquellos que tras la exploración eco-Doppler previa demostraran que son hemodinámicamente competentes, que no padecieran trastornos metabólicos del tipo de la diabetes o hipercolesterolemia.

La disponibilidad de muestras de segmentos competentes e incompetentes pertenecientes a un mismo paciente nos ha permitido realizar test de datos pareados que aportan una mayor eficiencia al contraste estadístico al eliminar la influencia de variables extrañas cuyos efectos no se desea que intervengan en el estudio. Ya hemos discutido que no existen diferencias estadísticas ni en la proporción de matriz extracelular ni en la proporción de fibras musculares entre estos dos tipos de segmentos, y que dicho resultado, en lo concerniente a la matriz extracelular, no coincide con un estudio similar realizado por García et al., quienes concluyen que la cantidad de colágeno en los segmentos incompetentes es significativamente mayor que en los segmentos competentes de un mismo paciente [García et al. 1999]. Sin embargo, la disparidad de resultados lo atribuimos al tipo de medición empleado en este último estudio (mediante una escala ordinal).

El análisis de la matriz extracelular y de las fibras musculares en función de la procedencia anatómica del segmento no muestra diferencias significativas en las muestras obtenidas de áreas insuficientes, en línea con los resultados de otros estudios [Travers et al. 1996; Venturi et al. 1996] aunque, al no haber podido realizar esta comparación en los sujetos control, no podemos indicar las variaciones que pudieran haberse producido en relación a ellos.

Desde un punto de vista histopatológico, la mayoría de los estudios [Rose et al. 1986; Sarmiento Ramos 1994; Porto et al. 1995; Travers et al. 1996; García et al. 1999; Khan et al. 2000; Sansilvestri-Morel et al. 2001; Wali et al. 2002[b]; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007], incluyendo el nuestro, muestran un aumento de la MEC en todas las capas de la pared venosa. Es decir, se detecta una fibrosis no uniforme, diseminada por toda la pared venosa en la que se aprecia una disposición desordenada de las fibras de colágeno y una ruptura de las capas musculares. La pérdida de la integridad de las capas musculares puede contribuir a la disminución de su contractibilidad y a la consecuente dilatación de la pared venosa.

Estas alteraciones han sido expresadas por algunos autores sugiriendo la existencia de una hipertrofia muscular con desorganización del tejido conectivo en la pared de venas insuficientes [Svejcar et al. 1963; Travers et al. 1996; Kockx et al. 1998; Khan et al. 2000], o la pérdida de células musculares lisas que serían reemplazadas por tejido fibroso [Rose et al. 1986]. Para Travers et al. estas contradicciones sugieren que la enfermedad está mas relacionada con la pérdida de funcionalidad de las CML, como consecuencia de la pérdida de su estructura a causa del tejido fibroso, que con la carencia de CML [Travers et al. 1996], y Khan et al. apuntan que la dilatación y otros signos de la enfermedad no son debidos a una deficiencia en los componentes de la pared venosa, sino más bien a la variación de su función normal [Khan et al. 2000].

Es decir, se desconoce si la separación entre las células musculares es consecuencia de la infiltración de colágeno o de una disfunción de las CML que es seguida de la infiltración de colágeno, pues se ha observado la aparición de tejido fibroso que aparentemente ha sido producido por las CML [Rose et al. 1996], desconociéndose cuál o cuáles son los detonantes exactos de este proceso, aunque se apunta a factores genéticos [Travers et al. 1996].

Estudios realizados con microscopía electrónica indican que el tejido fibroso está formado mayoritariamente por colágeno y, en menor medida, por fibras elásticas dispersas con una disposición irregular [Rose et al. 1986; Sarmiento Ramos 1994; García et al. 1999; Khan et al. 2000; Wali et al. 2002[b]; Wali et al. 2003; Elsharawy et al. 2007]. Esta sobreproducción de colágeno es debida al aumento de actividad de los fibroblastos y de otras células de la pared, como las células endoteliales y las musculares lisas [Sansilvestri-Morel et al. 2001]. La génesis exacta de este aumento de la producción de matriz extracelular es controvertida y se han propuesto varias explicaciones como la hipoxia de las células endoteliales, la anormal oxigenación de los tejidos o la modulación de la funcionalidad de las CML por el entorno hemodinámico local [Wali et al. 2003]. Khan et al. indican que las CML de las venas varicosas sufren una hiperplasia [Khan et al. 2000], perdiendo su aspecto fusiforme y emitiendo proyecciones de la membrana celular que deforman su aspecto. En su opinión estas células también son capaces de desprender material en forma de fibras, posiblemente colágeno, y terminar fragmentándose en pequeños trozos que se dispersan por la matriz extracelular, pudiendo encontrarse restos de estas células en la capa subintimal e, incluso, en la luz de la vena. También se ha observado la habilidad de las CML de fagocitar no sólo colágeno y fibras elásticas, sino también a otras CML dañadas [Wali et al. 2001; Elsharawy et al. 2007] de modo que la enfermedad varicosa podría estar relacionada con una disfunción de las CML, la cual sería responsable de la síntesis y catabolismo de colágeno y elastina, tal como ya dijo Venturi [Venturi et al. 1996].

En este sentido podemos citar que las células musculares lisas aumentan la producción de colágeno cuando se les somete a estiramiento mecánico de forma repetida [Chello et al. 1994; García et al. 1999], lo cual sucede constantemente en los casos de insuficiencia venosa pues la insuficiencia valvular permite el reflujo de un volumen sanguíneo que dilataría la vena de manera intermitente.

Los cambios endoteliales también se han relacionado con los cambios estructurales de la pared venosa. Se ha apreciado que en las venas sometidas a reflujo se puede producir una pérdida de células endoteliales que en los estadios más extremos acaba en un proceso de denudación total de la barrera endotelial. Dado que en el proceso de alteración de la pared venosa se ha producido una migración de las CML desde la capa media hasta la íntima [Sarmiento Ramos 1994; Wali et al. 2002[a]], la pérdida del endotelio haría que éstas quedaran expuestas al flujo sanguíneo lo que podría provocar sus cambios funcionales [Khan et al. 2000, Wali et al. 2003].

Por otro lado, se apunta que la fibrosis de la pared venosa es una característica de la vena asociada al incremento de la edad del sujeto, de modo que no puede suponerse

como un antecedente de la enfermedad venosa crónica, necesitándose de más factores o cambios que catalicen la aparición de la enfermedad [Kockx et al. 1998].

A la luz de los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos afirmar que la enfermedad venosa crónica conlleva un aumento de la proporción de matriz extracelular y una disminución de la proporción de fibras musculares en su pared, y que este fenómeno precede al de la aparición de reflujo. Esta conclusión es similar a la expresada por Elsharawy et al., quienes afirman que la dilatación de la pared y la pérdida de tono (rigidez) es consecuencia de su debilidad, y la incompetencia valvular es secundaria más que primaria [Elsharawy et al. 2007].

Otro aspecto interesante de las alteraciones que se presentan en la pared de las venas pertenecientes a pacientes con insuficiencia venosa es el ***comportamiento del tejido elástico***, lo cual ha sido ampliamente estudiado. Es evidente que la elasticidad es una de las propiedades físicas que se pierden en las venas varicosas, circunstancia asociada a que la degradación de la elastina reduce notablemente la fuerza de retracción de la pared de la vena, lo que disminuye la fuerza de oposición al alargamiento y el desarrollo de formas tortuosas [Chello et a. 1994].

Así, Chello et al. (1994) y García et al. (1999) indican que el aspecto de las fibras elásticas en los segmentos dilatados (incompetentes) es más grueso y con formas tortuosas, mientras que en los segmentos insuficientes aparentemente normales (competentes) las fibras elásticas son más finas y muy compactadas.

Elsharawy et al. (2007) ponen de manifiesto que la ruptura de las unidades contráctiles-elásticas alrededor de las CML provoca una disminución y desorganización de la elastina en dichas zonas y su agrupación en la capa adventicia, y Kockx et al. (1998) establece una fuerte correlación entre la aparición de hipertrofia de las CML y el patrón irregular de las fibras de elastina. Es decir, tal como ya expuso Venturi et al. (1996), parece existir una fuerte relación entre las alteraciones que se producen en la pared de las venas insuficientes y la disfunción en la capacidad de sintetizar y metabolizar elastina y colágeno por parte de las CML, bien por la reducción de la síntesis o la aceleración de su catabolismo, alterando su equilibrio con el resto de componentes de la pared [Venturi et al. 1996].

Desde otro punto de vista, se ha señalado que la lámina elástica interna aparece dañada, o ha desaparecido, en algunas zonas [Chello et al. 1994; Khan et al. 2000; Wali et al. 2002[b]; Wali et al. 2003] lo que parece facilitar la migración de células musculares lisas al subendotelio [Chello et al. 1994; García et al. 1999] y justifica la localización de restos de fibras elásticas en la capa subíntima e, incluso, en la luz tras la pérdida de la barrera endotelial [Wali et al. 2002[b]]. Los trabajos realizados sobre biopsias y modelos experimentales permiten especular con que la lámina elástica interna se degrada por una elastasa liberada por el endotelio vascular en respuesta al aumento de presión [Chello et al. 1994], de manera que el desequilibrio entre la elastasa y los inhibidores de la elastasa podría ser la causa de la reducción del contenido de elastina detectado,

contemplándose un exceso de elastasa, un defecto en los inhibidores o ambas circunstancias simultáneamente [Venturi et al. 1996].

Los resultados de nuestro estudio del componente elástico muestran que en los tres tipos de segmentos considerados (controles, competentes e incompetentes) existe una menor proporción de fibras elásticas en las capas íntima y media que en la adventicia, resultados que concuerdan con los de Kockx et al. (1998), Wali et al. (2003) y Elsharawy et al. (2007), quienes también observan una mayor acumulación de elastina en la capa adventicia.

En general, la mayoría de los autores consultados coinciden con nosotros en que la proporción de fibras elásticas disminuye significativamente en las venas procedentes de sujetos con patología varicosa frente a los sujetos controles [Andreotti et al. 1979; Gandhi et al. 1993; Chello et al. 1994; Venturi et al. 1996; Wali et al. 2002[b]; Wali et al. 2003; Peña et al. 2004; Elsharawy et al. 2007], aunque otros estiman que dicha diferencia no alcanza niveles de significación estadística [Travers et al. 1996; García et al. 1999]. Sin embargo, cuando se analiza si la alteración de las fibras elásticas es distinta en función de que el segmento estudiado haya estado sometido o no a reflujo, podemos afirmar que, en relación a los sujetos control, las venas safenas internas de estos sujetos presentan una disminución global, estadísticamente significativa, de su componente elástico; es decir, que afecta tanto a los sectores sometidos a reflujo como a los hemodinámicamente competentes y aunque el deterioro de los segmentos sometidos a reflujo es mucho mayor, el nivel de deterioro del tejido elástico entre los segmentos insuficientes competentes e incompetentes no alcanza el nivel de significación estadística ($p = 0.0599$), lo cual está en línea de lo comunicado por Gandhi et al. (1993) y, más recientemente, por Elsharawy et al. (2007).

De lo anteriormente expuesto queda claro que el tejido elástico disminuye en los pacientes con insuficiencia venosa, tanto en los sectores venosos sometidos a cambios hemodinámicos como en los que no y que, por tanto, los factores que lo ponen en marcha parecen ser independientes, seguramente anteriores, al desencadenamiento de la insuficiencia venosa. Es necesario, por consiguiente, intentar aclarar si el mayor deterioro en los segmentos sometidos a reflujo puede ser considerado consecuencia de las especiales condiciones de flujo y presión a las que están sometidas estas zonas de las venas. En tal sentido, el análisis estadístico de las mediciones de los segmentos competentes e incompetentes de los mismos sujetos nos ha permitido comprobar que el flujo retrógrado turbulento, el aumento de la presión ejercida sobre la pared de la vena incompetente, u otros factores no determinados, son capaces de aumentar la pérdida del tejido elástico puesto que la proporción presente en ellos es significativamente menor que en los segmentos competentes de los mismos pacientes. Aunque no utilizaron una metodología similar a la nuestra y, por tanto, sus resultados no pueden ser totalmente superponibles a los que nosotros hemos encontrado, Chello et al. (1994), Venturi et al. (1996) y García et al. (1999) encontraron resultados similares.

El análisis de la componente de fibras elásticas según la procedencia anatómica del segmento no se pudo realizar en los segmentos control ya que su número era muy

reducido, y los resultados en los segmentos insuficientes muestran que la proporción de fibras elásticas no varía con la región anatómica, independientemente de que fueran incompetentes o competentes, lo cual está en línea con los resultados de otros estudios [Travers et al. 1996; Venturi et al. 1996].

Sin embargo la alteración del tejido elástico no es homogéneo en toda la pared venosa puesto que hemos podido observar que existe una mayor proporción de fibras elásticas en la adventicia que en el resto de capas, al tiempo que el patrón de las fibras elásticas es más desorganizado en la íntima y en la media, tal como han señalado Kockx et al. (1998) y Wali et al. (2003).

En definitiva, los resultados obtenidos de nuestro estudio permiten confirmar el desequilibrio de las proporciones de las componentes de la pared venosa y que ello podría contribuir al debilitamiento de la pared, la pérdida de tono, su dilatación, y la insuficiencia valvular. Además, el estudio de segmentos competentes e incompetentes permite asegurar que las alteraciones de la pared venosa comienzan antes de que se produzcan cambios hemodinámicos objetivables con eco-Doppler, lo que elimina al flujo turbulento y al aumento de la presión como factores desencadenantes del proceso varicoso. Pero cuando comparamos los segmentos pertenecientes a los mismos sujetos que han estado, o no, sometidos a reflujo, se aprecia que el deterioro es mayor en los segmentos incompetentes, lo que permite asegurar que las alteraciones hemodinámicas sí son un factor agravante o acelerador de la alteración de la estructura de la pared de la vena. Las medidas del grosor de las capas de la pared son sugerentes de este proceso: inicialmente, cuando aún no existe reflujo actuando sobre la pared, se detecta un crecimiento de la íntima y de la media por proliferación celular e incremento de matriz y más tarde, fruto de la incompetencia, se inicia una atrofia no homogénea de la pared, lo que justifica tanto las irregularidades detectadas en la capa íntima como que la capa media de los segmentos competentes sea más gruesa que la de los segmentos incompetentes.

Finalmente, el hecho de basar el presente estudio en la obtención de datos cuantitativos ha permitido plantear, mediante el empleo de un ***análisis de correlación***, la existencia de relación lineal o asociación mutua entre los parámetros anteriormente medidos sobre las muestras (grosor de las capas íntima y media, proporción de fibras musculares, proporción de matriz extracelular y proporción de fibras elásticas) con la edad y el sexo del sujeto, dos de los factores epidemiológicos más aceptados en relación al desarrollo de la insuficiencia venosa.

Para medir la asociación con la edad del sujeto se empleó el coeficiente de correlación muestral de Pearson, y para la asociación con el sexo se empleó el coeficiente de correlación biserial puntual.

Los resultados de asociación entre los atributos medidos y la *edad del sujeto* muestran una correlación moderada ($-0.75 < \rho < -0.5$ ó $0.5 > \rho > 0.75$) en el caso de los segmentos control, con la única salvedad del grosor de la capa íntima que presenta un valor de correlación positivo y débil ($\rho = 0.376$). Las muestras de segmentos

insuficientes (competentes e incompetentes) muestran una escasa correlación con la edad del sujeto, con valores en el rango $-0.25 < \rho < 0.25$. Las pruebas de significación estadística indican que los valores de correlación muestrales descritos no son significativos en ningún caso.

Sin embargo a la luz del presente análisis es necesario tener en cuenta dos puntos importantes: por un lado, resaltar que el número de casos control en los que se conocía la edad del sujeto eran escasos lo que justificaría la falta de significación estadística de sus resultados y, por otro lado, en relación a los sujetos con patología venosa desarrollada, es importante hacer notar que la variable edad deberíamos considerarla de manera muy relativa pues desconocemos el tiempo de evolución de la insuficiencia y, por tanto, el tiempo que la vena ha estado sometida a hipertensión o flujo turbulento.

Sin embargo, a pesar de que estadísticamente no se demuestra relación significativa entre la edad y los parámetros estudiados, es evidente que en el caso de los sujetos controles parece existir una asociación más evidente puesto que se observa un incremento (valor de correlación positivo) del grosor de la capa íntima y de las proporciones de la MEC y de las fibras elásticas con la edad del sujeto, mientas que el grosor de la capa media y la proporción de las fibras musculares decrece con la edad (valor de correlación negativo).

Es decir, con datos objetivos podemos confirmar lo que, basándose tanto en los estudios epidemiológicos como en los estudios morfológicos analizados mediante la impresión subjetiva del observador, se acepta de manera generalizada: que conforme aumenta la edad del sujeto se producen una serie de cambios (aumento de la proporción de MEC, disminución de la proporción de fibras musculares, disminución del grosor de la capa íntima, …) que favorecerían el desarrollo de la enfermedad, tendencia ya indicada en la mayoría de publicaciones que consideran que la prevalencia de venas varicosas se incrementa con la edad [Álvarez-Fernández et al. 2008; Beebe-Dimmer et al. 2005] o en aquellas otras que señalan que es a partir de los 50-60 años cuando la pared venosa comienza a sufrir cambios atribuidos al envejecimiento con aumento de tejido fibroso (fleboesclerosis) [Travers et al. 1996].

Por su parte, la asociación entre los atributos medidos y el *sexo del sujeto* se calculó para las muestras de segmentos insuficientes, competentes e incompetentes. Los segmentos control se excluyeron de este análisis al no disponer del sexo de los sujetos de los que se extrajo estos segmentos.

Los resultados de asociación lineal de las proporciones de las componentes de fibras musculares, MEC y fibras elásticas con el sexo del sujeto muestran una correlación débil ($-0.5 < \rho < -0.25$ ó $0.25 > \rho > 0.5$) en los segmentos incompetentes, mientras el grosor de la capa íntima muestra un valor de correlación negativo y escaso ($\rho = -0.23$) con el sexo del sujeto. Por su parte, el grosor de la capa media, tanto en los segmentos incompetentes como en los competentes, muestra una correlación prácticamente nula con el sexo de los sujetos. Al igual que sucedió con el análisis de correlaciones con la edad, las pruebas de significación estadística indican que la mayoría de características

muestrales descritas no presentan una correlación significativa con el sexo del paciente. Sin embargo hay que hacer la importante salvedad de que la proporción de fibras elásticas en las muestras de los segmentos incompetentes sí muestran un comportamiento diferente en función del sexo del paciente ($p = 0.039$), mayor en las mujeres, y que los valores de significación estadística obtenidos para las proporciones de fibras musculares y MEC en los segmentos incompetentes son superiores pero relativamente cercanos al valor límite 0.05 (valores de $p \leq 0.1$ en ambos casos).

Los resultados obtenidos con respecto a la relación con el sexo de los sujetos nos permiten defender la existencia de un incremento (valor de correlación positivo) significativo de la proporción de fibras elásticas en los segmentos incompetentes en la población del sexo femenino con respecto a la de sexo masculino. Del mismo modo, podemos afirmar un incremento (valor de correlación positivo) de la proporción de la MEC y una disminución de la proporción de fibras musculares (valor de correlación negativo) en los segmentos incompetentes de la población de sexo femenino con respecto al sexo masculino; aunque en esta última afirmación el grado de confianza es ligeramente menor que en la primera afirmación. Dicho de otro modo, parece ser que la alteración hemodinámica en el flujo venoso provoca una reacción de la pared de la safena interna que es diferente en función del sexo de tal manera que en el caso de las mujeres hay una mayor cantidad de fibras elásticas y de matriz extracelular mientras que en el hombre hay mayor proporción de fibras musculares en estos segmentos incompetentes. Desde un punto de vista teórico, la mayor presencia de tejido elástico y la menor proporción de células musculares hablarían a favor de que los segmentos incompetentes de las mujeres deben poseer una mayor capacidad elástica al tiempo que una menor capacidad de contracción, lo que podría justificar el hecho de que en muchos de los estudios epidemiológicos se encuentre que la patología varicosa es más común en el género femenino, como se mantiene, por ejemplo, en el estudio de Beebe-Dimmer et al. (2005). Aunque consideramos incuestionables nuestros resultados, es precisa la realización de estudios posteriores conducentes a determinar si existen tales diferencias en las cualidades físicas de las venas incompetentes de hombres y mujeres.

Es necesario resaltar que ninguno de los estudios contemplados en la tabla 26 analiza las asociaciones entre los cambios estructurales de la pared venosa y la edad y el sexo de los sujetos. Sin embargo algunos indican salvaguardas con respecto a la influencia que tanto la edad como el sexo podrían tener sobre sus resultados. Así, Travers et al. (1996) y Wali et al. (2002[b]) indican que las discrepancias observadas en el contenido de colágeno en las venas insuficientes podrían estar vinculadas con la edad, sugiriendo la necesidad de realizar futuros estudios que compararan segmentos insuficientes dilatados y no dilatados con la edad y el sexo, además del estudio temporal de la enfermedad, lo que, en su mayor parte, hemos realizado en este trabajo.

También Sansilvestri-Morel et al. (2001) hace referencia al sesgo que la edad y el sexo pueden introducir en los resultados de este tipo de estudio y, repasando las características muestrales de los estudios señalados en la tabla 26 en lo que respecta a la edad y el género de los sujetos integrantes de la muestra, es evidente una gran

heterogeneidad. Así, por ejemplo, Mashiah et al. (1991) incluye únicamente muestras procedentes de mujeres con una edad de 19 a 42 años, el 84.3% de los sujetos incluidos en el estudio de García et al. (1999) son mujeres, Peña et al. (2004) presenta una muestra en la que las mujeres representan el 77.3% de los casos y Khan et al. (2000) extrae sus resultados de una muestra de pacientes con un rango de edad pequeño, de entre 37 y 44 años, mientras que en el estudio de Travers et al. (1996) los rangos de edad son bastante más amplios, de 34 a 64 años para los enfermos y de 38 a 76 años para los controles.

Tabla 26. Relación de estudios analizados*

Autores	Número de segmentos	Grosor capas	Colágeno	Fibra muscular	Elastina	Método**
Svejcar (1963)	24 vc/32 vi 20 vn		(%ps) vc <^{s} vn vi <^{s} vn vi < vc	(%ps) vc > vn vi >^{s} vn vi > vc	(%ps) vv > vn	Anal. bioq. Autoclave 100-resto
Niebes (1977)	9 vv 5 vn		(%ps) vv <^{s} vn			Micr. elect. Anal. bioq.
Andreotti (1979)	32 vv 34 vn		(%ps) vv <^{s} vn		(%ps) vv <^{s} vn	Anal. bioq.
Rose (1986)	300 vv		vv > vn			Micr. opt. Micr. elect.
Psaila (1989)	27 vv 50 vn	(longitud) Pared: vv > vn	(%ps) vv <^{s} vn			Microm. opt. Anal. bioq.
Maurel (1990)	14 vc/14 vi 15 vn		(%ps) vv >^{s} vn vc < vi			Anal. bioq.
Mashiah (1991)	29 vv	Media: vv < vn				Micr. elect.
Gandhi (1993)	4 vc/16 vi 7 vn		(%ps) vv >^{s} vn vc = vi		(%ps) vv <^{s} vn vc = vi	Anal. bioq.
Chello (1994)	20 vc/20 vi 20 vn		(%ps) vi >^{s} vn vc > vn vi > vc		(%ps) vi <^{s} vn vc < vn vi <^{s} vc	Anal. bioq.
Porto (1995)	10 vv 9 vn	(longitud) vv > vn	(%) vv > vn			Micr. opt. (micrómetro) Estereología

Autores	Número de segmentos	Grosor capas	Colágeno	Fibra muscular	Elastina	Método**
Travers (1996)	18 vv 10 vn	(longitud) vv > vn (área) vv >^{s} vn	(área) vv >^{s} vn (%) Media: vv >^{s} vn Pared: vv > vn	(área) Pared: vv >^{s} vn (%) Media: vv <^{s} vn Intima: vv < vn	(área) vv > vn (%) vv < vn	Estereología
Venturi (1996)	32 vc/47 vi 24 vn		(%ps) vi > vc > vn		(%ps) vi <^{s} vn vc < vn vi <^{s} vc	Anal. bioq.
Krasinski (1997)	8 vv 8 vn			(%) vv < vn		Estereometría
Kockx (1998)	29 vv 17 vn		(%) vv > vn	(%) vv = vn		Micr. opt. Micr. elect. Estereología
García (1999)	51 vc/51 vi 20 vn		vv >^{s} vn vi >^{s} vc		(Fib. Elásticas) vv < vn vi <^{s} vc	Baremación subjetiva
Khan (2000)	10 vv 5 vn	Intima: vv > vn	Intima: vv > vn	Intima: vv > vn		Micr. opt. Micr. elect.
Sansilvestri -Morel (2001)	22 vv 23 vn		(%ps) Media: vv >^{s} vn			Anal. bioq.
Wali (2001) (2002^{a}) (2002^{b})	10 vv 3 vn	(longitud) vv > vn (área) vv > vn	vv > vn	vv < vn	vv < vn	Micr. opt. Micr. elect.
Wali (2003)	46 vv 3 vn	Intima: vv > vn	vv > vn	vv < vn	vv < vn	Micr. opt.
Peña (2004)	22 vv 22 vn		(%) vv <^{s} vn		(%) vv <^{s} vn	PDI
Elsharawy (2007)	5 vc/19 vi 11 vn	(longitud) Intima: vv >^{s} vn Media: vv >^{s} vn vc < vi	(%) Intima: vv > vn Media: vv >^{s} vn vc = vi	(%) Media: vv > vn vc = vi	(%) vv <^{s} vn vc = vi	Micr. opt. Micr. elect. Analizador de imágenes
Velasco-Martin (2013)	10 pacientes entre casos y controles	Intima: vv > vn	Intima: vv > vn	Intima: vv < vn	(Fib. Elásticas) Intima: vv > vn (sólo estadios iniciales)	Micr. confocal PDI

* Leyenda: **vv** = segmentos varicosos, **vn** = segmentos normales, **vc** = segmentos varicosas competentes, **vi** = segmentos varicosas incompetentes, **<^{s}** ó **>^{s}** = la diferencia indicada es significativa (p<0.05), **<** ó **>** = la diferencia indicada no es significativa (*ver nota*), (**%ps)** = porcentaje del componente sobre peso seco de la muestra, **(%)** = porcentaje de superficie.

** Leyenda: **Anál. bioq.** = análisis bioquímico, **100-resto** = medida obtenida como (100 - resto componentes), **Micr. opt.** = microscopía óptica, **Micr. elect.** = microscopía electrónica, **Micr. confocal** = microscopía confocal, **Microm. opt.** = micrómetro óptico, **PDI** = procesamiento digital de la imagen.

Nota: en los estudios donde sólo se utiliza microscopía no se realizaron test de significación estadística, y por lo tanto la simbología indicada refleja únicamente el sentido de la diferencia.

7. CONCLUSIONES

7.1. CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS

En el diseño del trabajo planteamos una serie de objetivos generales y específicos sobre aspectos que, a nuestro conocimiento, no han sido abordados previamente en la literatura especializada. Antes de pasar a enumerar, de la manera clásicamente aceptada, las principales conclusiones del trabajo que presentamos, queremos hacer una valoración sobre la consecución de los objetivos propuestos.

- En relación al objetivo *"Explorar métodos de procesado digital de imágenes que permitieran la cuantificación fiable de tinciones habituales de histoquímica e inmunohistoquímica en el análisis de la pared venosa",* hemos demostrado no solo que es posible sino que, en consecuencia, es deseable su uso con la finalidad de evitar el sesgo subjetivo en las interpretaciones del estudio de las muestras histológicas cuando se trata de comparar a varias poblaciones entre sí.

- En cuanto al objetivo *"Explorar métodos estadísticos de inferencia y contraste de hipótesis para el análisis de los datos numéricos obtenidos de la pared venosa, aplicables a muestras de tamaño pequeño"*, hemos puesto de manifiesto la necesidad de verificar el cumplimiento de los requisitos necesarios de las técnicas estadísticas utilizadas, reconsiderando el uso de las técnicas estadísticas paramétricas que presuponen la normalidad de la muestra o de las técnicas no paramétricas que imponen condiciones referentes a la forma de la distribución de los grupos de datos. La población muestral de la mayor parte de los estudios que utilizan muestras histológicas humanas suele ser muy pequeña y, por tanto, el uso de dichos test puede inducir a resultados no fiables y errores de interpretación. Se hace necesario, por tanto, proponer y potenciar el uso de técnicas alternativas adecuadas a poblaciones de pequeño tamaño que no verifican los supuestos subyacentes de las técnicas tradicionalmente utilizadas.

- En relación a los objetivos específicos que rezan de la siguiente manera, *"Analizar estructural y morfométricamente las capas constituyentes de la pared de la vena insuficiente de segmentos competentes e incompetentes del mismo sujeto"* y *"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"*, podemos afirmar que su satisfacción está fuera de toda duda tanto por el hecho de que el análisis microscópico de las muestras es independiente de su procedencia como por el hecho de que la apropiada elección del método estadístico ha permitido el adecuado conocimiento de las características de cada población y su comparación con las de otros sujetos.

- Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo precisado como *"Determinar la influencia de las variables edad y sexo sobre la estructura de las venas de pacientes con enfermedad venosa crónica",* aunque podría considerarse, y de

hecho así lo es, una simple prolongación de los anteriores, cobra, desde nuestro punto de vista, especial importancia puesto que esas dos variables, edad y sexo, están íntimamente ligadas a la epidemiología de la enfermedad venosa. Sin embargo difícilmente pueden ser transportadas a una muestra histológica salvo que se cuente con un número suficiente de casos cuando de tejidos comunes a ambos géneros, como las venas, se trate. La metodología de trabajo empleada ha permitido dar cumplida cuenta a este objetivo.

- Cuando nos fijamos el propósito de *"Plantear una metodología que permitiera 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 estas son también válidas para la obtención de datos objetivos utilizando técnicas inmunohistoquímicas",* estábamos planteándonos la posibilidad de detallar o concretar un método de trabajo que facilitara la obtención de datos de manera incontestable a partir de técnicas de tinción básicas al tiempo que dejar sentados los argumentos para ser utilizados con técnicas más complejas de inmunohistoquímica las cuales, pudieran plantear problemas de interpretación. Entendemos que de la lectura del trabajo presentado se desprende que hemos cumplido satisfactoriamente con dicho objetivo.

En base a lo expuesto creemos que hemos dada cumplida respuesta al objetivo general, cuya finalidad era "*determinar si un método de cuantificación basado en el análisis digital de imágenes permitiría comparar las diferencias estructurales de la pared venosa sometida a diferentes condiciones fisiopatológicas"* (venas sanas, venas procedentes de pacientes con insuficiencia venosa y sometidas a reflujo y venas de los mismos pacientes pero no sometidas a reflujo). Es decir, creemos poder afirmar que la metodología empleada ha permitido obtener medidas objetivas y reproducibles, independientes del observador, facilitando un análisis estadístico riguroso.

7.2. CONCLUSIONES MÁS RELEVANTES DEL ESTUDIO

Teniendo en cuenta tanto lo anteriormente expuesto como los resultados aportados y la discusión que de ellos hemos realizado, pasamos a exponer las que consideramos conclusiones más significativas de nuestro trabajo:

1 - Es necesario conocer las características hemodinámicas de los segmentos venosos incluidos en los estudios que utilicen técnicas histológicas, mediante el empleo del eco-Doppler venoso para valorar su estado de competencia.

2 - La obtención de conclusiones en estudios histológicos, histopatológicos o morfométricos no deben basarse únicamente en la simple observación. Siempre que se pueda deben utilizarse métodos de cuantificación,

reproducibles por observadores independientes, tales como la obtención de imágenes digitales para su posterior análisis cuantitativo.

3 - Para los estudios abordados de la pared venosa se han mostrado efectivas las técnicas de segmentación de imágenes basados en el valor umbral y en el agrupamiento de píxeles por el color.

4 - Cuando se trabaja con poblaciones de pequeño tamaño muestral resulta adecuado el uso de test estadísticos de remuestreo, como alternativa a los paramétricos y no paramétricos de inferencia estadística puesto que, al no imponer severas condiciones en la distribución de la población, permiten obtener resultados respaldados estadísticamente.

5 - El engrosamiento de la íntima de los segmentos enfermos procedentes de zonas no sometidas a reflujo es uniforme mientras que el de los segmentos que sí están sometidos al flujo retrógrado presenta un engrosamiento irregular, alternando zonas muy ensanchadas junto a otras de menor grosor. Este comportamiento es similar en toda la extensión de la vena safena interna (cayado, muslo o pierna).

6 - En relación a los casos control, los segmentos venosos hemodinámicamente competentes de pacientes con insuficiencia venosa presentan un aumento del grosor de la capa íntima estadísticamente significativo.

7 - El grosor de la capa media de las venas sin insuficiencia venosa es significativamente menor que el de las venas de sujetos con insuficiencia venosa no sometidas a reflujo. Cuando están sometidas a reflujo también se produce un aumento del grosor de la capa media pero, en este caso, las diferencias con los controles no alcanzan niveles de significación estadística.

8 - La enfermedad venosa crónica conlleva un aumento de la proporción de matriz extracelular y una disminución de la proporción de fibras musculares en la pared de la vena safena interna y este fenómeno precede a la aparición del reflujo. Los efectos indicados han resultado significativos en ambos casos.

9 - El comportamiento de la capa media de las venas de pacientes con insuficiencia venosa es similar en los tres segmentos anatómicos estudiados: cayado, muslo y pierna.

10 - El tejido elástico disminuye en los pacientes con insuficiencia venosa, tanto en los sectores venosos sometidos a cambios hemodinámicos como en los que no, siendo mayor en los sectores sometidos a reflujo.

11 - Las alteraciones de la pared venosa comienzan antes de que se produzcan cambios hemodinámicos objetivables con eco-Doppler, lo que elimina al flujo turbulento y al aumento de la presión como factores desencadenantes del proceso varicoso.

12 - Cuando se comparan segmentos sometidos o no a reflujo pertenecientes a los mismos sujetos, se aprecia que el deterioro es mayor en los segmentos incompetentes, lo que permite asegurar que las alteraciones hemodinámicas sí son un factor agravante o acelerador de la alteración de la estructura de la pared de la vena.

13 - Aunque estadísticamente no se demuestra relación significativa entre la edad y los parámetros estudiados, en el caso de los sujetos controles se observa una tendencia hacia un ligero incremento del grosor de la capa íntima y de las proporciones de la MEC y de las fibras elásticas con la edad del sujeto, mientas que el grosor de la capa media y la proporción de las fibras musculares decrece con la edad. Siendo estas variaciones menos evidentes en los segmentos afectados.

14 - La presencia de reflujo parece provocar una reacción diferente en función del sexo del paciente. Las mujeres presentan, aparentemente, una mayor cantidad de fibras elásticas y de matriz extracelular que los hombres mientras que los hombres muestran una mayor proporción de fibras musculares que las mujeres en estos segmentos incompetentes.

7.3. RESPUESTA A LOS CONTRASTES DE HIPÓTESIS PLANTEADOS

El cumplimiento de los objetivos de partida y los hallazgos expresados a modo de conclusiones, permiten dar respuesta a las hipótesis de trabajo con las que nos enfrentábamos al inicio del trabajo y cuya definición básica era conocer si:

La presencia o ausencia de reflujo en la vena insuficiente determina la modificación de sus elementos estructurales.

A partir de ella, planteamos las siguientes hipótesis nulas y alternativas y, globalmente, las respuestas alcanzadas son las siguientes:

Contraste de hipótesis 1

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.

Respuesta 1

La pared de segmentos venosos pertenecientes a pacientes con insuficiencia venosa localizadas en zonas donde aún no existe reflujo venoso, ya presenta alteraciones estructurales en relación a los sujetos controles, aunque no de tanta intensidad como la de los segmentos sometidos a reflujo. Es decir, se acepta la hipótesis nula.

Contraste de hipótesis 2

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.

Respuesta 2

Aunque la pared venosa se altera sin la presencia de reflujo, su existencia provoca un aumento de las alteraciones estructurales. Por tanto rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alternativa.

Contraste de hipótesis 3

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.

Respuesta 3

Si bien desde el punto de vista estructural, son escasas las relaciones estadísticamente significativas con la edad y el sexo de los sujetos, sí es evidente que la presencia de reflujo provoca cambios estructurales que son diferentes en ambos sexos. No obstante ello creemos necesario realizar nuevos estudios con la finalidad de confirmarlo con mayor detalle.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abramson J.H., Hopp C., Epstein L.M. (1981). The epidemiology of varicose veins. A survey in western Jerusalem. *J. Epidemiol Community Health*, 35(3): 213-217.

Agu O., Hamilton G., Baker D.M., Dashwood M.R. (2002). Endothelin Receptors in the Aetiology and Pathophysiology of Varicose Veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23(2): 165-171.

Altman D.G. (1991). *Practical Statistics for Medical Research.* Cap. 16: The medical literature. London: Chapman and Hall.

Álvarez-Fernández L.J., Lozano F, Marinel.lo-Roura J. Masegosa-Medina J.A. (2008). Encuesta epidemiológica realizada en España sobre la insuficiencia venosa crónica en España: estudio DETECT-IVC 2006. *Angiología*, 60(1): 27-36.

Andreotti L., Cammelli D. (1979). Connective Tissue in Varicose Veins. *Angiology*, 30(12): 798-805.

Arnoldi C.C. (1957). The aetiology of primary varicose veins. *Dan Med Bull*, 4(3): 102-107.

Arribas S.M., Hinek A., González M.C. (2006). Elastic fibers and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther*, 111(3): 771-791.

Ascher E., Jacob T., Hingorani A., Gunduz Y., Mazzariol F., Kallakuri S. (2000). Programmed Cell Death (Apoptosis) and Its Role in the Pathogenesis of Lower Extremity Varicose Veins. *Ann Vasc Surg*, 14(1): 24-30.

Ascher E., Jacob T., Hingorani A., Tsemekhin B., Gunduz Y. (2001). Expression of molecular mediators of apoptosis and their role in the pathogenesis of lower-extremity varicose veins. *J Vasc Surg*, 33(5): 1080-1086.

Aunapuu M., Arend A. (2005). Histopathological changes and expression of adhesion molecules and laminin in varicose veins. *Vasa*, 34(3): 170-175.

Badier-Commander C., Verbeuren T., Lebard C., Michel J.B., Jacob M.P. (2000). Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol*, 192(1): 105-112.

Badier-Commander C., Couvelard A., Henin D., Verbeuren T., Michel J.B., Jacob M.P. (2001). Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An in situ study. *J Pathol*, 193(3): 398-407.

Bajaj S., Sharma S., Agarwal S., Pruthi J. (2013). A Survey: Medical Image Processing Applications with ImageJ. *International Journal of Information and Computation Technology,* 3(9): 927–932.

Banjo A.O. (1987). Comparative study of the distribution of venous valves in the lower extremities of black Africans and Caucasians: pathogenetic correlates of prevalence of primary varicose veins in the two races. *Anat Rec*, 217(4): 407-412.

Basu A., Haldar S. (1998). The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*, 4(12): 1099-1109.

Beaglehole R., Prior I.A., Salmond C.E., Davidson F. (1975). Varicose veins in the South Pacific. *Int J Epidemiol*, 4(4): 295-299.

Beebe H.G., Bergan J.J., Bergqvist D., Eklof B., Eriksson I., Goldman M.P. et al. (1996). Classification and Grading of Chronic Venous Disease in the Lower Limbs. A Consensus Statement. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 12(4): 487-492.

Beebe-Dimmer J.L., Pfeifer J.R., Engle J.S., Schottenfeld D. (2005). The Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency and Varicose Veins. *Ann Epidemiol*, 15(3): 175-184.

Bellmunt S., Miquel C., Reina L., Lozano F. (2013). La insuficiencia venosa crónica en el Sistema Nacional de Salud. Diagnóstico, indicaciones quirúrgicas y priorización de listas de espera. Documento de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular (SEACV) y del Capítulo de Flebología y Linfología de la SEACV. *Angiología*, 65(2): 61-71.

Belsare A.D., Mushrif M.M. (2012). Histopathological Image Analysis Using Image Processing Techniques: An overview. *Signal and Image Processing: An International Journal*, 3(4): 23- 36.

Bergan J.J., Schmid-Schönbein G.W., Coleridge Smith P.D., Nicolaides A.N., Boisseau M., Eklof B. (2006). Mechanism of Disease: Chronic Venous Disease. *N Engl J Med*, 355(5): 488-498.

Bergan J. (2007). Molecular Mechanism in Chronic Venous Insufficiency. *Ann Vasc Surg*, 21(3): 260-266.

Biland L., Widmer L.K. (1988). Varicose veins (VV) and chronic venous insufficiency (CVI). Medical and socio-economic aspects, Basle study. *Acta Chir Scand Suppl*, 544: 9-11.

Bishara A.J., Hittner J.B. (2012). Testing the Significance of a Correlation with Non-normal Data: Comparison of Pearson, Spearman, Transformation, and Resampling Approaches. *Psychol Methods,* 17(3): 399-417.

Boisseau M.R. (2007). Leukocyte involvement in the signs and symptoms of chronic venous disease. Perspectives for therapy. *Clin Hemorheol Microcirc*, 37(3): 277-290.

Brand F.N., Dannenberg A.L., Abboth R.D., Kannel W.B. (1988). The epidemiology of varicose veins: the Framingham study. *Am J Prev Med*, 4(2): 96-101.

Brice G., Mansour S., Bell R., Collin J.R., Child A.H., Brady A.F., Sarfarazi M., Burnand K.G., Jeffery S., Mortimer P., Murday V.A. (2002). Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrome in 74 patients with *FOXC2* mutations or linkage to 16q24. *J Med Genet*, 39(7): 478-483.

Buján J., Jiménez-Cossio J.A., Jurado F., Gimeno M.J., Pascual G., García-Honduvilla N., Dominguez B., Bellón J.M. (2000). Evaluation of the smooth muscle cell component and apoptosis in the varicose vein wall. *Histol Histopathol*, 15(3): 745-752.

Buján J., Gimeno M.J., Jiménez A., Kielty C.M., Mecham R.P., Bellón J.M. (2003). Expression of Elastic Components in Healthy and Varicose Veins. *World J Surg*, 27(8): 901-905.

Burkitt D.P. (1972). Varicose Veins, Deep Vein Thrombosis, and Haemorrhoids: Epidemiology and Suggested Aetiology. *Br Med J*, 2(5813): 556-561.

Butar Butar F. (2007). Permutation Test for More Than Two Samples. *Journal of Mathematical Science & Mathematics Education,* 2(2): 20-29.

Caggiati A., Bergan J.J. (2002). The saphenous vein: Derivation of its name and its relevant anatomy. *J Vasc Surg*, 35(1): 172-175.

Calderón Montero F.J. (2007). *Fisiología aplicada al deporte* (2ª edición). Cap. 7: sistema venoso o de baja presión (p. 125-135). Madrid: Tebar.

Callam M.J. (1994). Epidemiology of varicose veins. *Br J Surg*, 81(2): 167-173.

Callejas J.M., Manasanch J., **ETIC Group. (2004).** Epidemiology of chronic venous insufficiency of the lower limbs in the primary care setting. *Int Angiol*, 23(2): 154-163.

Carrasco E., Díaz S., González A.I., Permanyer J. (2004). *Guía de buena práctica clínica en patología venosa*. Madrid: International Marketing & Communications.

Coleridge Smith P.D. (1999). Neutrophil activation and Mediators of inflammation in chronic venous insufficiency. *J Vasc Res*, 36(Suppl 1): 24-36.

Cornu-Thenard A., Boivin P., Baud J.M., Carpentier P.H. (1994). Familial inheritance of primary varicosis. A clinical evaluation of 134 families. *J Dermatol Surg*, 20(5): 318-326.

Criqui M.H., Jamosmos M., Fronek A., Denenberg J.O., Langer R.D., Bergan J., Golomb B.A. (2003). Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study. *Am J Epidemiol*, 158(5): 448-456.

Cuevas E., Zaldívar D., Pérez M. (2010). *Procesamiento Digital de Imágenes con Matlab y Simulink*. Madrid: Ra-Ma.

Chaudhry H.L., Mortimer P.S., Evans J.E., Dormandy J.A. (1997). The prevalence of venous disease in primary lymphoedema. *Phlebology*, 12(1): 31-35

Chello M., Mastroroberto P., Romano R., Cirillo F., Cusano T., Marchese A.R. (1994). Alteration in collagen and elastin content in varicose vein. *Vasc Endovascular Surg*, 28(1): 23-27.

Chinchilla A. (1841). *Anales históricos de la medicina en general, y biográfico-bibliográfico de la española en particular*. Historia General de la Medicina, tomo 1º (p. 419-429). Valencia.

Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G.K. (2006). Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*, 11(4): 506-525.

Davies M.G., Hagen P.O. (1993). The Vascular Endothelium: A New Horizon. *Ann Surg*, 218(5): 593-609.

Davis E.C. (1992). *Interrelationship of endothelial and smooth muscle cells to elastic laminae in the mouse aortic wall during development: An ultrastructural, immunohistochemical and radioautographic study*. Tesis Doctoral. Department of Anatomy. McGill University, Montreal.

Ducasse E., Giannakakis K., Speziale F., Midy D., Sbarigia E., Baste J.C., Faraggiana T. (2008). Association of Primary Varicose Veins with Dysregulated Vein Wall Apoptosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 35(2): 224-229.

Ducimetiere P., Richard J.L., Pequignot G., Warnet J.M. (1981). Varicose veins: a risk factor for atherosclerotic disease in middle-aged men? *Int J Epidemiol*, 10(4): 329-335.

Eklof B., Perrin M., Delis K.T., Rutherford R.B., Gloviczki P. (2009). Updated terminology of chronic venous disorders: The VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *J Vasc Surg*, 49(2): 498-501.

Elsharawy M.A., Naim M.M, Abdelmaguid E.M., Al-Mulhim A.A. (2007). Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 6(2): 219-224.

Erceg-Hurn D.M., Mirosevich V.M. (2008). Modern Robust Statistical Methods: An Easy Way to Maximize the Accuracy and Power of Your Research. *Am Psychol,* 63(7): 591-601.

Evans C.J., Fowkes F.G., Ruckley C.V., Lee A.J. (1999). Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health*, 53(3): 149-153.

Fernandes-Taylor S., Hyun J.K., Reeder R.N., Harris A.H. (2011). Common statistical and research design problems in manuscripts submitted to high-impact medical journals, *BMC Res Notes*, 4:304.

Fleischmajer R., Perlish J.S., Burgeson R.E., Shaikh-Bahai F., Timpl R. (1990). Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 580: 161-175.

Gandhi R.H., Irizarry E., Nackman G.B., Halpern V.J., Mulcare R.J., Tilson M.D. (1993). Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg*, 18(5): 814-820.

García A., Romero R., Gutierrez J.A., López J., Ardilla F., Bermúdez F.J. (1999). Estudio de la matriz extracelular en la pared de las venas varicosas primarias. *Angiología*, 51(5): 197-202.

García-Gimeno M., Rodríguez-Camarero S., Tagarro-Villaba S., Ramalle-Gomara E., González-González E., Arranz M.A., García D.L., Puerta C.V. (2009). Duplex mapping of 2036 primary varicose veins. *J Vasc Surg*, 49(3): 681-689.

García-Herrera A. L., Moliner Cartaya M. (2010). Algunos apuntes en la historia de la cirugía vascular. *Rev Med Electrón*, 32 (supl 7).

Gesto-Castromil R., Grupo DETECT-IVC, García J.J. (2001). Encuesta epidemiológica realizada en España sobre la prevalencia asistencial de la insuficiencia venosa crónica en Atención Primaria. Estudio DETECT-IVC. *Angiología*, 53(4): 249-260.

Ghasemi A., Zahediasl S. (2012). Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *Int J Endocrinol Metab*, 10(2): 486-489.

Golledge J., Quigley F.G. (2003). Pathogenesis of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 25(4): 319-324.

Good P.I. (2005). *Resampling Methods. A Practical Guide to Data Analysis* (3ª edición). Cap. 2: Estimating Population Parameters y Cap. 3: Comparing two Populations. Boston: Birkhäuser.

Gray H. (1918). *Anatomy of the Human Body* (20ª edición). Cap. VII: The Veins. Philadelphia: Lea & Febiger.

Grimm S., Bauer M.K., Baeuerle P.A., Schulze-Osthoff K. (1996). Bcl-2 Down-regulates the Activity of Transcription Factor NF-κβ Induced upon Apoptosis. *J Cell Biol*, 134(1): 13-23.

Gurcan M.N., Boucheron L.E., Can A., Madabhushi A., Rajpoot N.M., Yener B. (2009). Histopathological Image Analysis: A Review. *IEEE Rev Biomed Eng*, 2: 147- 171.

Haimovici H. (1987). Role of precapillary arteriovenous shunting in the pathogenesis of varicose veins and its therapeutic implications. *Surgery*, 101(5): 515-522.

Hauge M., Gundersen J. (1969). Genetics of varicose veins of the lower extremities. *Hum Hered*, 19(5): 573-580.

Haviarova Z., Janega P., Durdik S., Kovac P., Mraz P., Stvrtinova V. (2008). Comparison of collagen subtype I and III presence in varicose and non-varicose vein walls. *Bratisl Lek Listy*, 109(3): 102-105.

Hoekstra R., Kiers H.A., Johnson A. (2012). Are assumptions of well-known statistical techniques checked, and why (not)? *Front Psychol*, 3:137.

Hoffmann J., Haendeler J., Aicher A., Rössig L., Vasa M., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2001). Aging Enhances the Sensitivity of Endothelial Cells Toward Apoptotic Stimuli: Important Role of Nitric Oxide. *Circ Res*, 89(8): 709-715.

Homans J. (1916). The operative treatment of varicose veins and ulcers based upon a classification of these lesions. *Surg Gyn Obst*, 22: 143.

Jacob M.P. (2003). Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*, 57(5-6): 195-202.

Jaén Martínez J., Lejeune M., Pons Ferré L.E., Salvadó Usach M.T., García Rojo M., Lopez Pablo C., Baucells Lluís J., Cugat Mata X., Bosch Príncep R., Álvaro Naranjo T. (2005). Análisis cuantitativo de técnicas inmunohistoquímicas. Mejora de resultados mediante aplicación de software de análisis de imágenes digitales. *VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.* http://www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp?id_trabajo=285.

Janowski K., Sopiński M., Topol M. (2007). Changes in the wall of the great saphenous vein at consecutive stages in patients suffering from chronic vein disease of the lower limbs. *Folia Morphol*, 66(3): 185-189.

Jawien A. (2003). The influence of environmental factors in chronic venous insufficiency. *Angiology*, 54(suppl 1): S19-S31.

Jurukova Z., Milenkov C. (1982). Ultrastructural evidence for collagen degradation in the walls of varicose veins. *Exp Mol Pathol*, 37(1): 37-47.

Karin M., Lin A. (2002). NF-κβ at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 3(3): 221-227.

Khan A.A., Eid R.A., Hamdi A. (2000). Structural changes in the tunica intima of varicose veins: a histopathological and structural study. *Pathology*, 32(4): 253-257.

Kistner R.L., Sparkuhl M.D. (1979). Surgery in acute and chronic venous disease. *Surgery*, 85(1): 31-43.

Kistner R.L., Eklof B., Masuda E.M. (1996). Diagnosis of chronic venous disease of the lower extremities: the CEAP classification. *Mayo Clinic Proc*, 71(4): 338-435.

Knaapen M.W., Somers P., Bortier H., De Meyer G.R., Kockx M.M. (2005). Smooth Muscle Cell Hypertrophy in Varicose Veins Is Associated with Expression of Estrogen Receptor-beta. *J Vasc Res*, 42(1): 8-12.

Kockx M.M., Knaapen M.W., Bortier H.E., Cromheeke K.M., Boutherin-Falson O., Finet M. (1998). Vascular remodeling in varicose veins. *Angiology*, 49(11): 871-877.

Kockx M.M., Knaapen M.W. (2000). The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol*, 190(3): 267-280.

Kosinski C. (1926). Observations on the Superficial Venous System of the Lower Extremity. *J Anat*, 60(2): 131-142.

Kothari S., Phan J.H., Stokes T.H., Wang M.D. (2013). Pathology imaging informatics for quantitative analysis of whole-slide images. *J Am Med Inform Assoc*, 20(6): 1099-1108.

Krasinski Z., Kotwicka M., Oszkinis G., Dzieciuchowicz L., Borkiewicz P., Waśko R., Gabriel M. (1997). Investigations on the pathogenesis of primary varicose veins. *Wiad Lek*, 50(10-12): 275-280.

Kucukguven A., Khalil R.A. (2013). Matrix Metalloproteinases as Potential Targets in the Venous Dilation Associated with Varicose Veins. *Curr Drug Targets*, 14(3): 287-324.

Labropoulos N. (2003). Hemodynamic changes according to the CEAP classification. *Phlebolymphology*, 40: 130-136.

Laurinavicius A., Laurinaviciene A., Dasevicius D., Elie N., Plancoulaine B., Bor C., Herlin P. (2012). Digital image analysis in pathology: benefits and obligation. *Anal Cell Pathol*, 35(2): 75-78.

Law C., Bunyan D., Castle B., Day L., Simpson I., Westwood G., Keeton B. (2006). Clinical features in a family with an R460H mutation in transforming growth factor beta receptor 2 gene. *J Med Genet*, 43(12): 908-916.

Le Flem L., Mennen L., Aubry M.L., Aiach M., Scarabin P.Y., Emmerich J., Alhenc-Gelas M. (2001). Thrombomodulin Promoter Mutations, Venous Thrombosis, and Varicose Veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(3): 445-451.

Lee A.J., Evans C.J., Allan P.L., Ruckley C.V., Fowkes F.G. (2003). Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. *J Clin Epidemiol*, 56(2): 171-179.

Lee J.D., Lu L.Y., Cheng W.H., Jeng S.Y. (2009). Dysregulated apoptosis through the intrinsic pathway in the internal spermatic vein of patients with varicocele. *J Formos Med Assoc*, 108(8): 612-618.

Lee J.D., Yang W.K., Lai C.H. (2010). Involved intrinsic apoptotic pathway in the varicocele and varicose veins. *Ann Vasc Surg*, 24(6): 768-774.

Leon K., Mery D., Pedreschi F., León J. (2006). Color measurement in *L*a*b** units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10): 1084-1091.

Lim C.S., Davies A.H. (2009). Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*, 96(11): 1231-1242.

Lim C.S., Kiriakidis S., Paleolog E.M., Davies A.H. (2012). Increased activation of the hypoxia-inducible factor pathway in varicose veins. *J Vasc Surg*, 55(5): 1427-1439.

Linton R.R. (1938). The communicating veins of the lower leg and the operative technic for their ligation. *Ann Surg*, 107(4): 582-593.

Liu S.Q., Fung Y.C. (1998). Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein graft. *Ann Biomed Eng*, 26(1): 86-95.

Liu S.Q., Tieche C., Tang D., Alkema P. (2003). Pattern formation of vascular smooth muscle cells subject to nonuniform fluid shear stress: Role of PDGF-beta receptor and Src. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*, 285(3): 1081-1090.

López-Loyo E.S. (2011). Patología de las várices. *Gac Méd. Caracas*, 119(2): 119-126.

Lozano F., Jiménez-Cossío J.A., Ulloa J., grupo RELIEF. (2001). La insuficiencia venosa crónica en España. Estudio epidemiológico RELIEF. *Angiología*, 53(1): 5-16.

Lozano Sánchez F.S., Carrasco Carrasco E., Díaz Sánchez S., Escudero Rodríguez J.R., Marinel.lo Roura J., Sánchez Nevarez I. (2001). Determinantes de la gravedad en la insuficiencia venosa crónica. Estudio C-VIVES. *Angiología*, 65(1): 1-9.

Lurie F., Kistner R.L., Eklof B., Kessler D. (2003). Mechanism of venous valve closure and role of the valve in circulation: A new concept. *J Vasc Surg*, 38(5): 955-961.

Macenko M., Niethammer M., Marron J.S., Borland D., Woosley J.T., Guan X., Schmitt C., Thomas N.E. (2009). A Method for Normalizing Histology Slides for Quantitative Analysis. *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, Boston (USA), pp. 1107-1110.

Madabhushi A. (2009). Digital pathology image analysis: opportunities and challenges. *Imaging Med,* 1(1): 7-10.

Martínez Rodrigo J.J. (2006). Insuficiencia venosa crónica. Tratamiento en las unidades de Radiología Intervencionista. *Intervencionismo*, 1: 2-5.

Mashiah A., Rose S.S., Hod I. (1991). The scanning electron microscope in the pathology of varicose veins. *Isr J Med Sci*, 27(4): 202-206.

Matousek V., Prerovsky I. (1974). A contribution to the problem of the inheritance of primary varicose veins. *Hum Hered*, 24(3): 225-235.

Maurel E., Azema C., Deloly J., Bouissou H. (1990). Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: A biochemical study. *Clin Chim Acta*, 193(1-2): 27-37.

Mezei T., Horvath E., Turcu M., Gurzu S., Raica M., Jung I. (2012). Microvascular density in non-Hodgkin B-cell lymphomas measured using digital morphometry. *Rom J Morphol Embryol*, 53(1): 67-71.

Michiels C., Arnould T., Thibaut-Vercruyssen R., Bouaziz N., Janssens D., Remacle J. (1997). Perfused human saphenous veins for the study of the origin of varicose veins: Role of the endothelium and of hipoxia. *Int Angiol*, 16(2): 134-141.

Michiels C., Arnould T., Remacle J. (2000). Endothelial cell responses to hypoxia: Initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1497(1): 1-10.

Michiels C., Bouaziz N., Remacle J. (2002). Role of the endothelium and blood stasis in the appearance of varicose veins. *Int Angiol*, 21(1): 18-25.

Milroy C.M., Scott D.J., Beard D.J., Horrocks M., Bradfield J.W. (1989). Histological appearances of the long saphenous vein. *J Pathol*, 159(4): 311-316.

Miot H.A., Brianezi G. (2010). Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *An Bras Dermatol*, 85(3): 361-364.

Miyauchi K. (1913). Die Häufigkeit der varizen am unterschenkel bei Japanerm und Erfolg einiger operativ behandelter Fälle. *Arch Klin Chir*, 100: 1079-1085.

Moore D.S., McCabe G.P., Craig B.A. (2003). *Introduction to the Practice of Statistic* (7ª Edición). Bootstrap Methods and Permutation Tests. New York: W. H. Freeman and Company.

Moore K.L. (2007). *Anatomía con orientación clínica* (5ª edición). Cap. 5: miembro inferior (p. 579-583). México: Médica Panamericana.

Moura R., Tjwa M., Vandervoort P., Cludts K., Hoylaerts M.F. (2007). Thrombospondin-1 Activates Medial Smooth Muscle Cells and Triggers Neointima Formation Upon Mouse Carotid Artery Ligation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(10): 2163-2169

Mullane D.J. (1952). Varicose veins in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 63(3): 620-628.

Naoum J.J., Hunter G.C., Woodside K.J., Chen C. (2007). Current Advances in the Pathogenesis of Varicose Veins. *J Surg Res*, 141(2): 311-316.

Niebes P., Engels E., Jegerlehner M.L. (1977). Studies on Normal and Varicose Human Saphenous Veins. II. Differences in the Composition of Collagen and Glycosaminoglycans. *Bibl Anat*, (16 Pt 2): 301-303.

Nicolaides A.N. (2000). Investigation of Chronic Venous Insufficiency: A Consensus Statement. *Circulation*, 102(20): E126-163.

Ojdana D., Safiejko K., Lipska A., Sacha P., Wieczoreck P., Radziwon P., Dadan J., Tryniszewska E. (2009). The inflammatory reaction during chronic venous disease of lower limbs. *Folia Histochem Cytobiol*, 47(2): 185-189.

Oklu R., Habito R., Mayr M., Deipolyi A.R., Albadawi H., Hesketh R., Walker T.G., Linskey K.R., Long C.A., Wicky S., Stoughton J., Watkins M.T. (2012). Pathogenesis of Varicose Veins. *J Vasc Interv Radiol*, 23(1): 33-39.

Ortega F., Mompeo B., Sarmiento L., Centol A., Saavedra P., Bergan J. (1997). Comparison of Saphenous Veins Removed for Primary Venous Insufficiency with Cadaver Saphenous Veins. *Vasc Endovascular Surg*, 31(5): 663-670.

Ortega-Santana F., Limiñana J.M., Ruano F., Ortega-Centol A., Palomino-Martín A., Jiménez F. (2014). The Influence of the CIVIQ Dimensions on Quality of Life of Patients with Primary Superficial Venous Incompetence. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 48(4): 452-458.

Pannier-Fisher F., Rabe E. (2003). Epidemiology of chronic venous diseases. *Hautarzt*, 54(11): 1037-1044.

Parra J.R., Cambria R.A., Hower C.D., Dassow M.S., Freischlag J.A., Seabrook G.R., Towne J.B. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg*, 28(4): 669-675.

Parry D.A. (1988). The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem*, 29(1-2): 195-209.

Peña J.L., Norambuena C., Bello N. (2004). Patrón de expresión de la matriz extracelular entre las paredes de las venas varicosas y no varicosas. *CIMEL*, 9(1): 12-16.

Pertusa Grau J.F. (2010). *Técnicas de análisis de imagen: Aplicaciones en Biología* (2ª edición). Cap. 5: La imagen digital, Cap. 8 y 9: Procesado de imagen. Valencia: Publicaciones de la Universidad de Valencia.

Pett M.A. (1997). *NonParametric Statistics for Health Care Research. Statistics for Small Samples and Unusual Distributions.* California: SAGE Publications.

Poblete R. (1994). *Patología Arterial y Venosa* (p. 634-646). Chile: Sociedad de Cirujanos de Chile.

Pocard M. (1997). Varicose veins and methods used to cut them: from the Ebers papyrus to Trendelenburg. *Ann Chir*, 51(7): 710-712.

Porter J.M., Moneta G.L. (1995). Reporting standards in venous disease: an update. International consensus committee on chronic venous disease. *J Vasc Surg*, 21(4): 635-645.

Porto L.C., da Silveira P.R., de Carvalho J.J., Panico M.D. (1995). Connective tissue accumulation in the muscle layer in normal and varicose saphenous veins. *Angiology*, 46(3): 243-249.

Porto L.C., Ferreira M.A., Costa A.M., da Silveira P.R. (1998). Immunolabeling of type IV collagen, laminin and alpha-smooth muscle actin cells in the intima of normal and varicose saphenous veins. *Angiology*, 49(5): 391-398.

Porto L.C., Alves Azizi M.A., Pelajo-Machado M., Matos da Silveira P.R., Lenzi H.L. (2002). Elastic Fibers in Saphenous Varicose Veins. *Angiology*, 53(2): 131-140.

Psaila J.V., Melhuish J. (1989). Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Br J Surg*, 76(1): 37-40.

Qi B., Newcomer R.G., Sang Q.X. (2009). ADAM19/adamalysin 19 structure, function, and role as a putative target in tumors and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, 15(20): 2336-2348.

Qui Y., Quijano R.C., Wang S.K., Hwang N.H. (1995). Fluid dynamics of venous valve closure. *Ann Biomed Eng*, 23(6): 750-759.

Raffeto J.D., Khalil R.A. (2008). Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology*, 23(2): 85-98.

Ramos M., Salach S., Lecuna N. (2000). Varices del miembro inferior. *Revista de posgrado de la VIª Cátedra de Medicina.* Corrientes (Argentina): Facultad de Medicina-Universidad Nacional del Nordeste. Revista 98.

Rehm H.L., Gutiérrez-Espeleta G.A., Garcia R., Jiménez G., Khetarpal U., Priest J.M., Sims K.B., Keats B.J., Morton C.C. (1997). Norrie disease gene mutation in a large Costa Rican kindred with a novel phenotype including venous insufficiency. *Hum Mutat*, 9(5): 402-408.

Ritman E.L., Lerman A. (2007). The Dynamic Vasa Vasorum. *Cardiovasc Res*, 75(4): 649-658.

Robertson L., Evans C., Fowkes F.G. (2008). Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology*, 23(3): 103-111.

Rose S.S., Ahmed A. (1986). Some thoughts on the aetiology of varicose veins. *J Cardiovasc Surg*, 27(5): 534-543.

Ross M.H., Pawlina W. (2007). *Histología* (5ª edición). Cap. 13: Aparato Cardiovascular (p. 417-418). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Ruifrok A.C., Johnston D.A. (2001). Quantification of Histochemical Staining by Color Deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, 23(4): 291-299.

Rutherford R.B. (1995). *Vascular Surgery* (4ª edición). Philadelphia (USA): WB Saunders Company.

Saharay M., Shields D.A., Georgiannos S.N., Porter J.B., Scurr J.H., Coleridge Smith P.D. (1998). Endothelial activation in patients with chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 15(4): 342-349.

Saiki S., Sakai K., Saiki M., Kitagawa Y., Umemori T., Murata K., Matsui M., Hirose G. (2006). Varicose veins associated with CADASIL result from a novel mutation in the Notch3 gene. *Neurology*, 67(2): 337-339.

Sansilvestri-Morel P., Rupin A., Badier-Commander C., Kern P., Fabiani J.N., Verbeuren T.J., Vanhoutte P.M. (2001). Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res*, 38(6): 560-568.

Sarmiento Ramos L. (1994). *Adaptaciones morfológicas de la vena femoral de la rata Sprague-Dawley inducidas por la hipertensión venosa experimental. Sus analogías con la insuficiencia crónica humana*. Tesis Doctoral. Departamento de Morfología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Schanzer H., Peirce E.C. (1982). Pathophysiologic evaluation of chronic venous stasis with ambulatory venous pressure studies. *Angiology*, 33(3): 183-191.

Schuller-Petrovic S., Siedler S., Kern T., Meinhart J., Schmidt K., Brunner F. (1997). Imbalance between the endothelial cell-derived contracting factors prostacyclin and angiotensin II and nitric oxide/cyclic GMP in human primary varicosis. *Br J Pharmacol*, 122(4): 772-778.

Seidell J.C., Bakx K.C., Deurenberg P., van den Hoogen H.J., Hautvast J.G., Stijnen T. (1986). Overweight and chronic illness—a retrospective cohort study, with a follow-up of 6-17 years, in men and women of initially 20-50 years of age. *J Chronic Dis*, 39(8): 585-593.

Seletchi E.D. (2008). A Medical Image Processing using MATLAB. *Proceedings of Journal Information Systems & Operations Management*, 2(1): 194-210.

Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399(6735): 483-487.

Silva F.J., Pinto de Moraes H., Pedra Dias E. (2004). Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. *Braz Oral Res,* 18(2): 100–104.

Simovart H.E., Aunapuu M., Lieberg J., Roosaar P., Arend A. (2010). Age-related changes in apoptosis and expressions of intercellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor receptor type 2 in the wall of varicose veins. *Int Angiol*, 29(6): 507-513.

Simovart H.E., Arend A., Lieberg J., Aunapuu M. (2011). Associations of NF-kappaB and Bax with Apoptosis in Varicose Veins of Women of Different Age Groups. *Int J Vasc Med*: Article ID 639720.

Sisto T., Reunanen A., Laurikka J., Impivaara O., Heliövaara M., Knekt P., Aromaa A. (1995). Prevalence and risk factors of varicose veins in lower extremities: mini-Finland health survey. *Eur J Surg*, 161(6): 405-414.

Somers P., Knaapen M. (2006). The Histopathology of Varicose Vein Disease. *Angiology*, 57(5): 546-555.

Strasak A.M., Zaman Q., Pfeiffer K.P., Göbel G., Ulmer H. (2007). Statistical errors in medical research – a review of common pitfalls, *Swiss Med Wkly*, 137(3-4): 44–49.

Svejcar J., Prerovsky I., Linhart J., Kruml J., Beckova B. (1963). Content of collagen, elastin, and hexosamine in primary varicose veins. *Clin Sci*, 24: 325-330.

Tavizón O.E., Alonzo-Romero L. (2009). Algunos aspectos clínico-patológicos de la úlcera de pierna. *Dermatología Rev Mex*, 53(2): 80-91.

Thulesius O. (1996). The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency. *Int Angiol*, 15(2): 114-118.

Tolivia J., Navarro A., del Valle E., Pérez C., Ordoñez C., Martínez E. (2006). Application of Photoshop and Scion Image Analysis to Quantification of Signals in Histochemistry, Immunocytochemistry and Hybridocytochemistry. *Anal Quant Cytol Histol*, 28(1): 43-53.

Travers J.P., Brookes C.E., Evans J., Baker D.M., Kent C., Makin G.S., Mayhew T.M. (1996). Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 11(2): 230-237.

Tretbar L. (1999). *History of Medical and Surgical Treatment of Varicose Veins.* Cap. 6: Venous Disorders of the Legs (p. 71-80). London: Springer-Verlag.

Tuominen V.J., Ruotoistenmäki S., Viitanen A., Jumppanen M., Isola J. (2010). ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res*, 12(4): R56.

Uhl J.F., Guilllot C. (2013). Anatomy and embryology of the small saphenous vein: nerve relationships and implications for treatment. *Phlebology*, 28(1): 4-15.

Urbanek T., Skop B., Wiaderkiewicz R., Wilczok T., Ziaja K., Lebda-Wyborny T., Pawlicki K. (2004). Smooth Muscle Cell Apoptosis in Primary Varicose Veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28(6): 600-611.

Van Kuppevelt T.H., Veerkamp J.H., Timmermans J.A. (1995). Immunoquantification of type I, III, IV and V Collagen in Small Samples of Human Lung Parenchyma. *Int J Biochem Cell Biol*, 27(8): 775-782.

Velasco-Martin J.P., Regadera J., Rubio M., Rodriguez-Rodriguez P., Gutierrez-Arzapalo P.Y., España-Caparros G., Arribas S.M. (2013). Evolución de la fibrosis intimal y elastogénesis en venas varicosas: estudio inmunohistoquímico y morfométrico. *Poster XXXVI Reunión Anual de la CEAP 2013.*

Venturi M., Bonavina L., Annoni F., Colombo L., Butera C., Peracchia A., Mussini E. (1996). Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J Surg Res*, 60(1): 245-248.

Wali M.A., Eid R.A. (2001). Smooth muscle changes in varicose veins: an ultrastructural study. *J Smooth Muscle Res*, 37(5-6): 123-135.

Wali M.A., Eid R.A. (2002). Intimal changes in varicose veins: An ultrastructural study. *J Smooth Muscle Res*, 38(3): 63-74.

Wali M.A., Eid R.A. (2002). Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int Angiol*, 21(4): 337-343.

Wali M.A., Dewan M., Eid R.D. (2003). Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int Angiol*, 22(2): 188-193.

Wallach D., Kang T.B., Kovalenko A. (2008). The extrinsic cell death pathway and the élan mortel. *Cell Death Differ*, 15(10): 1533-1541.

Waksman Y., Mashiah A., Hod I., Rose S.S., Friedman A. (1997). Collagen subtype pattern in normal and varicose saphenous veins in humans. *Isr J Med Sci*, 33(2): 81-86.

Watanabe T., Pakala R., Katagiri T., Benedict C.R. (2001). Monocyte chemotactic protein 1 amplifies serotonin-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Res*, 38(4): 341-349.

Welsh U., Sobotta J. (2006). *Histología* (2ª Edición). Cap. 5: Aparato Cardiovascular. Madrid: Médica Panamericana.

WHO. (1998). Cardiovascular disease and steroid hormone contraception. Report of a WHO Scientific Group. Geneva, World Health Organization 1998 (WHO Technical Report Series, No. 877: 1-89).

Wilcox R.R. (1998). How Many Discoveries Have Been Lost by Ignoring Modern Statistical Methods? *Am Psychol,* 53(3): 300-314.

Witten I.H., Frank E., Hall M.A. (2011). *Data Mining. Practical Machine Learning Tools and Techniques* (3ª edición). Cap. 4: Algorithms. The Basic Methods (p. 138-143). Massachusetts (USA): Morgan Kaufmann Publishers.

Wollman R., Stuurman N. (2007). High throughput microscopy: from raw images to discoveries. *J Cell Sci*, 120(Pt 21): 3715-3722.

Woodside K.J., Hu M., Burke A., Murakami M., Pounds L.L., Killewich L.A., Daller J.A., Hunter G.C. (2003). Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg*, 38(1): 162-169.

Xu H., Mandal M. (2015). Epidermis segmentation in skin histopathological images based on thickness measurement and k-means algorithm. *EURASIP J Image Video Process,* 2015:18.

Zhang W.D., Bai H.Z., Sawa Y., Yamakawa T., Kadoba K., Taniguchi K., Masuda J., Ogata J., Shirakura R., Matsuda H. (1999). Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts. *J Vasc Surg*, 30(1): 169-183.

9. ANEXOS

En los anexos 1 a 4 se muestra la información disponible de cada muestra de vena. Los campos utilizados, con una breve explicación de su codificación, son:

Muestra: número identificativo de la muestra.
Procedencia: {Cayado|Muslo|Pierna}.
Segmento: {Competente|Incompetente}.
Control: indica si la muestra es control o no.
Intima: grosor de la capa íntima de la muestra, medido en μm.
IntEstrecha: grosor de la capa íntima en la zona estrecha, únicamente medido en muestras de segmentos incompetentes, medido en μm.
IntAncha: grosor de la capa íntima en la zona ancha, únicamente medido en muestras de segmentos incompetentes, medido en μm.
Media: grosor de la capa media de la muestra, medido en μm.
Sexo: {H|M}.
Edad: en años.
Sujeto: la etiqueta indicada no presenta ningún significado, siendo su propósito agrupar las muestras extraídas de un mismo sujeto. Las muestras extraídas del mismo sujeto tienen la misma etiqueta en este campo.
AreaIntMed: área de las capas íntima y media, medido en píxeles.
AreaAdv: área de la capa adventicia, medido en píxeles.
AreaPared: área de la pared venosa, medido en píxeles.
AreaMusculo: área de la componente de fibras musculares, medido en píxeles.
AreaMEC: área de la componente de matriz extracelular, medido en píxeles.
FEIntMed: área de la componente de fibras elásticas en las capas íntima y media, medido en píxeles.
FEAdv: área de la componente de fibras elásticas en la capa adventicia, medido en píxeles.
DenFM: proporción de la componente de fibras musculares.
DenMEC: proporción de la componente de matriz extracelular.
DenFE: proporción de la componente de fibras elásticas.

El símbolo *NM* utilizado en las tablas hace referencia a la *No Medida* del dato.
El símbolo *NA* utilizado en las tablas hace referencia a la *No Disponibilidad* del dato.

ANEXO 1

Medidas de grosor de las capas

Muestra	Procedencia	Segmento	Control	Intima	IntEstrecha	IntAncha	Media	Sujeto
4142	Pierna	competente	si	131.617	NM	NM	478.274	C1
4150	Cayado	competente	si	192.0	NM	NM	387.5	C3
4162	Cayado	competente	si	126.862	NM	NM	371.294	C4
4167	Cayado	competente	si	159.646	NM	NM	423.538	C8
4168	Muslo	competente	si	113.7355	NM	NM	382.896	C5
4169	Pierna	competente	si	166.579	NM	NM	401.651	C8
4170	Cayado	competente	si	122.023	NM	NM	337.5	C6
4181	Cayado	competente	si	147.146	NM	NM	419.452	C9
4182	Pierna	competente	si	125.0665	NM	NM	493.1345	C9
4183	Cayado	competente	si	176.3415	NM	NM	481.4225	C7
4712	Cayado	incompetente	no	NM	67.101	164.853	199.601	V18
4713	Pierna	competente	no	311.989	NM	NM	333.364	V18
4715	Muslo	competente	no	296.454	NM	NM	688.4735	V19
4725	Cayado	competente	no	275.478	NM	NM	397.5494	V5
4726	Pierna	competente	no	193.8943	NM	NM	647.8933	V6
4727	Cayado	competente	no	220.2584	NM	NM	361.5765	V7
4728	Cayado	competente	no	221.4723	NM	NM	447.5919	V7
4731	Cayado	competente	no	161.67	NM	NM	450.0	V17
4733	Cayado	incompetente	no	NM	105.542	371.2385	704.0855	V6
4738	Cayado	incompetente	no	NM	76.043	295.545	373.071	V20
4739	Pierna	competente	no	231.126	NM	NM	387.8675	V20
4740	Cayado	incompetente	no	NM	67.999	240.112	279.912	V21
4741	Muslo	competente	no	232.0875	NM	NM	633.371	V21
4744	Cayado	competente	no	121.67	NM	NM	593.33	V9
4745	Muslo	competente	no	180.239	NM	NM	480.0	V9
4748	Cayado	incompetente	no	NM	51.789	107.55	275.326	V22
4749	Pierna	competente	no	125.623	NM	NM	557.64	V22
4750	Cayado	incompetente	no	NM	53.707	330.378	491.719	V23
4751	Pierna	competente	no	142.463	NM	NM	625.7495	V23
4752	Cayado	incompetente	no	NM	87.324	346.859	485.33	V24
4753	Muslo	competente	no	295.5435	NM	NM	384.8025	V24
4765	Cayado	incompetente	no	NM	110.297	259.898	262.81	V25
4767	Cayado	incompetente	no	NM	68.787	202.0295	266.266	V26
4768	Muslo	incompetente	no	NM	58.199	276.7445	325.439	V26
4769	Muslo	competente	no	131.405	NM	NM	477.4505	V26
4773	Cayado	incompetente	no	NM	74.742	319.4265	419.832	V27
4774	Pierna	incompetente	no	NM	57.954	195.4625	432.233	V28
4775	Cayado	incompetente	no	NM	220.996	355.462	579.111	V28
4786	Cayado	competente	no	353.309	NM	NM	396.9145	V29
4787	Pierna	competente	no	130.222	NM	NM	361.218	V29
4790	Cayado	competente	no	209.779	NM	NM	608.293	V30
4791	Pierna	competente	no	363.796	NM	NM	325.127	V30
4797	Muslo	competente	no	183.33	NM	NM	443.33	V10
4799	Pierna	competente	no	113.67	NM	NM	280.0	V11
4800	Cayado	incompetente	no	NM	106.1055	306.1045	575.0845	V12
4803	Pierna	competente	no	108.33	NM	NM	413.33	V13
4806	Muslo	competente	no	129.965	NM	NM	644.878	V31
4807	Muslo	incompetente	no	NM	56.9907	152.962	503.226	V31
4808	Muslo	competente	no	146.838	NM	NM	538.23	V31
4811	Cayado	incompetente	no	NM	92.716	424.521	474.835	V32
4812	Muslo	competente	no	168.395	NM	NM	524.285	V32
4813	Cayado	incompetente	no	NM	119.255	293.468	666.6845	V14
4814	Pierna	incompetente	no	NM	96.4795	133.33	525.2005	V14
4815	Cayado	incompetente	no	NM	54.958	188.427	428.2295	V33
4816	Muslo	incompetente	no	NM	83.249	231.072	401.648	V33
4817	Cayado	incompetente	no	NM	74.15	376.755	630.677	V34
4818	Muslo	incompetente	no	NM	119.5355	306.6875	534.6685	V8
4819	Muslo	competente	no	287.9395	NM	NM	751.462	V34
4826	Cayado	incompetente	no	NM	81.771	304.1435	440.159	V35
4827	Muslo	competente	no	177.5485	NM	NM	488.5745	V35
4832	Cayado	incompetente	no	NM	113.0685	328.323	421.11	V15
4833	Pierna	incompetente	no	NM	81.1585	371.383	705.239	V15
4836	Cayado	competente	no	103.711	NM	NM	496.67	V16
4837	Cayado	competente	no	151.67	NM	NM	500.0	V1

Muestra	Procedencia	Segmento	Control	Intima	IntEstrecha	IntAncha	Media	Sujeto
4839	Cayado	competente	no	251.322	NM	NM	721.0565	V36
4840	Muslo	competente	no	108.871	NM	NM	357.469	V36
4842	Muslo	competente	no	148.609	NM	NM	418.589	V36
4846	Cayado	competente	no	396.723	NM	NM	791.907	V37
4847	Muslo	competente	no	392.8395	NM	NM	402.541	V37
4848	Cayado	incompetente	no	NM	115.745	530.317	655.931	V38
4849	Pierna	incompetente	no	NM	86.192	253.932	491.14	V38
4863	Pierna	incompetente	no	NM	148.073	570.2175	532.571	V2
4925	Muslo	competente	no	176.67	NM	NM	456.67	V3
4926	Pierna	competente	no	211.667	NM	NM	493.33	V3
4928	Pierna	incompetente	no	NM	133.243	391.699	656.336	V4

ANEXO 2

Medidas de extensión de fibra muscular y matriz extracelular

Muestra	Procedencia	Segmento	Control	AreaPared	AreaMusculo	AreaMEC
4167	Cayado	competente	si	881308	463947	400652
4168	Muslo	competente	si	560191	368073	184037
4169	Pierna	competente	si	1357728	555212	773334
4181	Cayado	competente	si	1493321	854024	620368
4182	Pierna	competente	si	1815579	911260	887821
4183	Cayado	competente	si	2225106	1300099	888953
4712	Cayado	incompetente	no	1749126	677794	1030278
4713	Pierna	competente	no	1086258	427771	649602
4715	Muslo	competente	no	2729438	1189436	1515778
4738	Cayado	incompetente	no	1780531	831776	913621
4739	Pierna	competente	no	1251785	574072	651021
4740	Cayado	incompetente	no	1545955	687028	840593
4741	Muslo	competente	no	1548970	638359	885549
4748	Cayado	incompetente	no	1423908	473103	925017
4749	Pierna	competente	no	1438859	594070	830890
4750	Cayado	incompetente	no	1846962	740692	1090328
4751	Pierna	competente	no	1916860	677875	1188942
4752	Cayado	incompetente	no	2578612	1133217	1421036
4753	Muslo	competente	no	1318644	604153	692407
4765	Cayado	incompetente	no	1221519	453742	740674
4767	Cayado	incompetente	no	1531326	585010	933560
4768	Muslo	incompetente	no	1094279	354902	722771
4769	Muslo	competente	no	1381519	465110	906672
4773	Cayado	incompetente	no	2350565	1274679	1018947
4774	Pierna	incompetente	no	1552034	852533	679957
4775	Cayado	incompetente	no	1970742	851666	1097869
4786	Cayado	competente	no	2286995	978117	1273898
4787	Pierna	competente	no	1177976	466969	700712
4790	Cayado	competente	no	2133497	809652	1292005
4791	Pierna	competente	no	1813358	804970	994044
4806	Muslo	competente	no	2422448	996290	1362018
4807	Muslo	incompetente	no	2307934	1026959	1238497
4808	Muslo	competente	no	1570697	772924	792606
4811	Cayado	incompetente	no	1366811	751321	591716
4812	Muslo	competente	no	2106071	721614	1337382
4815	Cayado	incompetente	no	1534222	685903	832883
4816	Muslo	incompetente	no	1361419	516395	826671
4817	Cayado	incompetente	no	2542845	1114622	1404172
4819	Muslo	competente	no	1917860	864255	1040304
4826	Cayado	incompetente	no	2053579	829291	1217180
4827	Muslo	competente	no	1254355	685012	547060
4839	Cayado	competente	no	2400428	1107133	1254351
4840	Muslo	competente	no	2040513	1122293	887625
4842	Muslo	competente	no	875166	325600	532512
4846	Cayado	competente	no	2151867	1156910	987566
4847	Muslo	competente	no	1042292	545140	484074
4848	Cayado	incompetente	no	2230491	1120563	1075280
4849	Pierna	incompetente	no	1996759	711338	1261759

ANEXO 3

Medidas de extensión de fibra elástica

Muestra	Procedencia	Segmento	Control	AreaIntMed	FEIntMed	AreaAdv	FEAdv
4150	Cayado	competente	si	1310155	84374	1165177	97483
4162	Cayado	competente	si	945596	64206	897719	92277
4167	Cayado	competente	si	891124	109430	454158	82906
4168	Muslo	competente	si	420214	60889	679781	83713
4169	Pierna	competente	si	1041324	122668	282723	49111
4170	Cayado	competente	si	596137	55858	772297	75036
4181	Cayado	competente	si	669429	80867	901665	105817
4182	Pierna	competente	si	1501159	111386	760378	74209
4183	Cayado	competente	si	1033996	111258	813501	100554
4712	Cayado	incompetente	no	989975	39995	1082228	78514
4713	Pierna	competente	no	1026897	54939	377078	26440
4715	Muslo	competente	no	2014752	61047	572310	27440
4725	Cayado	competente	no	1183343	67581	1273327	113648
4726	Pierna	competente	no	1648466	84896	590050	19550
4727	Cayado	competente	no	1134046	52661	1076578	58175
4728	Cayado	competente	no	928391	63494	1340494	87681
4731	Cayado	competente	no	1023091	36936	834191	50599
4733	Cayado	incompetente	no	1815093	68429	593176	28563
4738	Cayado	incompetente	no	761091	45038	1040537	77954
4739	Pierna	competente	no	875104	54869	840013	42249
4740	Cayado	incompetente	no	708711	41269	1178303	62602
4741	Muslo	competente	no	1015000	80794	623737	43373
4744	Cayado	competente	no	1668536	115129	628954	37091
4745	Muslo	competente	no	1728247	83820	880445	61312
4748	Cayado	incompetente	no	755158	45385	730777	41387
4749	Pierna	competente	no	927080	54605	705613	85749
4750	Cayado	incompetente	no	1128626	53564	1007155	78074
4751	Pierna	competente	no	1678801	60897	519416	56727
4752	Cayado	incompetente	no	1225482	64828	1392262	67816
4753	Muslo	competente	no	854054	62773	804838	87965
4765	Cayado	incompetente	no	1057234	43286	572879	37943
4767	Cayado	incompetente	no	1328752	73102	862070	63427
4768	Muslo	incompetente	no	884274	74929	398818	28132
4769	Muslo	competente	no	1169041	115852	964033	86265
4773	Cayado	incompetente	no	1701477	42231	312947	25319
4774	Pierna	incompetente	no	1508876	28858	922643	44586
4775	Cayado	incompetente	no	1472016	31555	772085	40103
4786	Cayado	competente	no	959080	33376	1412362	72321
4787	Pierna	competente	no	977935	42149	330590	21546
4790	Cayado	competente	no	1461039	45000	668784	32236
4791	Pierna	competente	no	1353152	66981	745268	38628
4797	Muslo	competente	no	1109307	40046	963848	25683
4799	Pierna	competente	no	1291497	88855	392739	33997
4800	Cayado	incompetente	no	917756	45796	669815	42803
4803	Pierna	competente	no	347654	28751	948102	59102
4806	Muslo	competente	no	1795830	80094	743398	66332
4807	Muslo	incompetente	no	1904327	39610	576935	42112
4808	Muslo	competente	no	1144078	47136	837694	82863
4811	Cayado	incompetente	no	817588	25671	1326330	88890
4812	Muslo	competente	no	1398169	29928	822067	56862
4813	Cayado	incompetente	no	1343446	53857	891711	61813
4814	Pierna	incompetente	no	1214390	46811	664481	68714
4815	Cayado	incompetente	no	820100	25685	1024618	111618
4816	Muslo	incompetente	no	1699591	30063	548398	19888
4817	Cayado	incompetente	no	1919412	13052	759209	60625
4818	Muslo	incompetente	no	1975714	30426	523628	43617
4819	Muslo	competente	no	1695267	88832	532880	67446

Muestra	Procedencia	Segmento	Control	AreaIntMed	FEIntMed	AreaAdv	FEAdv
4826	Cayado	incompetente	no	1099106	25829	956040	96327
4827	Muslo	competente	no	779208	34441	897895	85651
4832	Cayado	incompetente	no	739739	39650	1587823	93520
4833	Pierna	incompetente	no	1424397	33046	301435	24160
4836	Cayado	competente	no	806986	51405	1778618	122258
4837	Cayado	competente	no	1297574	87197	916860	76448
4839	Cayado	competente	no	1425758	18820	1424037	138383
4840	Muslo	competente	no	938561	13046	1019439	57137
4842	Muslo	competente	no	752971	13177	458271	27654
4846	Cayado	competente	no	1409120	30437	1084249	59541
4847	Muslo	competente	no	1690412	31512	765264	37560
4848	Cayado	incompetente	no	940001	26414	1120965	67309
4849	Pierna	incompetente	no	1059399	49863	491047	34181
4863	Pierna	incompetente	no	2182280	158870	537280	35113
4925	Muslo	competente	no	938086	50469	1213746	87562
4926	Pierna	competente	no	924038	67732	1138643	95051
4928	Pierna	incompetente	no	2067456	94637	442721	85964

ANEXO 4

Relación de medidas calculadas, sexo y edad de los sujetos

Muestra	Procedencia	Tipo	Intima	Media	DenFM	DenMEC	DenFE	Edad	Sexo
4142	Pierna	control	131.617	478.274	NM	NM	NM	NA	NA
4150	Cayado	control	192	387.5	NM	NM	7.35	NA	NA
4162	Cayado	control	126.862	371.294	NM	NM	8.49	NA	NA
4167	Cayado	control	159.646	423.538	52.64	45.46	14.30	55	NA
4168	Muslo	control	113.7355	382.896	65.70	32.85	13.15	NA	NA
4169	Pierna	control	166.579	401.651	40.89	56.96	12.97	55	NA
4170	Cayado	control	122.023	337.5	NM	NM	9.57	NA	NA
4181	Cayado	control	147.146	419.452	57.19	41.54	11.88	17	NA
4182	Pierna	control	125.0665	493.1345	50.19	48.90	8.21	17	NA
4183	Cayado	control	176.3415	481.4225	58.43	39.95	11.46	17	NA
4712	Cayado	incompetente	115.977	199.601	38.75	58.90	5.72	63	M
4713	Pierna	competente	311.989	333.364	39.38	59.80	5.80	63	M
4715	Muslo	competente	296.454	688.4735	43.58	55.53	3.42	30	M
4725	Cayado	competente	275.478	397.5494	NM	NM	7.38	67	H
4726	Pierna	competente	193.8943	647.8933	NM	NM	4.67	34	M
4727	Cayado	competente	220.2584	361.5765	NM	NM	5.19	59	M
4728	Cayado	competente	221.4723	447.5919	NM	NM	7.02	59	M
4731	Cayado	competente	161.67	450	NM	NM	4.82	59	M
4733	Cayado	incompetente	238.3902	704.0855	NM	NM	4.03	34	M
4738	Cayado	incompetente	185.794	373.071	46.72	51.31	6.83	53	M
4739	Pierna	competente	231.126	387.8675	45.86	52.00	5.66	53	M
4740	Cayado	incompetente	154.0555	279.912	44.44	54.37	5.50	70	H
4741	Muslo	competente	232.0875	633.371	41.21	57.17	7.58	70	H
4744	Cayado	competente	121.67	593.33	NM	NM	6.63	55	H
4745	Muslo	competente	180.239	480	NM	NM	5.56	55	H
4748	Cayado	incompetente	79.6695	275.326	33.23	64.96	5.84	40	M
4749	Pierna	competente	125.623	557.64	41.29	57.75	8.60	40	M
4750	Cayado	incompetente	192.0425	491.719	40.10	59.03	6.16	65	M
4751	Pierna	competente	142.463	625.7495	35.36	62.03	5.35	65	M
4752	Cayado	incompetente	217.0915	485.33	43.95	55.11	5.07	48	M
4753	Muslo	competente	295.5435	384.8025	45.82	52.51	9.09	48	M
4765	Cayado	incompetente	185.0975	262.81	37.15	60.64	4.98	55	H
4767	Cayado	incompetente	135.4083	266.266	38.20	60.96	6.23	44	M
4768	Muslo	incompetente	167.4718	325.439	32.43	66.05	8.03	44	M
4769	Muslo	competente	131.405	477.4505	33.67	65.63	9.48	44	M
4773	Cayado	incompetente	197.0842	419.832	54.23	43.35	3.25	48	H
4774	Pierna	incompetente	126.7083	432.233	54.93	43.81	2.86	31	H
4775	Cayado	incompetente	288.229	579.111	43.215	55.71	3.10	31	H
4786	Cayado	competente	353.309	396.9145	42.77	55.70	4.46	71	M
4787	Pierna	competente	130.222	361.218	39.64	59.48	4.87	71	M
4790	Cayado	competente	209.779	608.293	37.95	60.56	3.63	32	H
4791	Pierna	competente	363.796	325.127	44.39	54.82	5.03	32	H
4797	Muslo	competente	183.33	443.33	NM	NM	3.17	40	M
4799	Pierna	competente	113.67	280	NM	NM	7.29	63	M
4800	Cayado	incompetente	206.105	575.0845	NM	NM	5.58	58	M
4803	Pierna	competente	108.33	413.33	NM	NM	6.78	33	M
4806	Muslo	competente	129.965	644.878	41.13	56.22	5.77	38	M
4807	Muslo	incompetente	104.9763	503.226	44.50	53.66	3.29	38	M
4808	Muslo	competente	146.838	538.23	49.21	50.46	6.56	38	M
4811	Cayado	incompetente	258.6185	474.835	54.97	43.29	5.34	34	H
4812	Muslo	competente	168.395	524.285	34.26	63.50	3.91	34	H
4813	Cayado	incompetente	206.3615	666.6845	NM	NM	5.00	60	M
4814	Pierna	incompetente	114.9048	525.2005	NM	NM	5.94	60	M
4815	Cayado	incompetente	121.6925	428.2295	44.71	54.29	6.85	31	H
4816	Muslo	incompetente	157.1605	401.648	37.93	60.72	2.13	31	H
4817	Cayado	incompetente	225.4525	630.677	43.83	55.22	2.75	NA	H
4818	Muslo	incompetente	213.1115	534.6685	NM	NM	2.96	NA	H
4819	Muslo	competente	287.9395	751.462	45.06	54.24	7.01	NA	H
4826	Cayado	incompetente	192.9573	440.159	40.38	59.27	5.94	35	H
4827	Muslo	competente	177.5485	488.5745	54.61	43.61	7.16	35	H
4832	Cayado	incompetente	220.6957	421.11	NM	NM	5.72	65	H
4833	Pierna	incompetente	226.2707	705.239	NM	NM	3.31	65	H

Muestra	Procedencia	Tipo	Intima	Media	DenFM	DenMEC	DenFE	Edad	Sexo
4836	Cayado	competente	103.711	496.67	NM	NM	6.72	45	M
4837	Cayado	competente	151.67	500	NM	NM	7.39	50	M
4839	Cayado	competente	251.322	721.0565	46.12	52.26	5.52	56	H
4840	Muslo	competente	108.871	357.469	55.00	43.50	3.58	56	H
4842	Muslo	competente	148.609	418.589	37.20	60.85	3.37	56	H
4846	Cayado	competente	396.723	791.907	53.76	45.89	3.61	51	M
4847	Muslo	competente	392.8395	402.541	52.30	46.44	2.81	51	M
4848	Cayado	incompetente	323.031	655.931	50.24	48.21	4.55	47	M
4849	Pierna	incompetente	170.062	491.14	35.62	63.19	5.42	47	M
4863	Pierna	incompetente	359.1452	532.571	NM	NM	7.13	32	H
4925	Muslo	competente	176.67	456.67	NM	NM	6.41	24	M
4926	Pierna	competente	211.667	493.33	NM	NM	7.89	24	M
4928	Pierna	incompetente	262.471	656.336	NM	NM	4.11	49	H