

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Estudio Inmunohistoquímico y
Morfométrico de las Lesiones
Iniciales de la Formación de Varices
en la Vena Safena Interna**

TESIS DOCTORAL

Luis Manuel Reparaz Asensio

Madrid, 2015

AGRADECIMIENTOS:

*al Dr. **Gabriel España Caparrós**, por su generosidad al incluirme en la línea de investigación de su equipo, por su apoyo intelectual en la dirección de este estudio y por nuestra amistad de tantos años.*

*al Prof. Dr. **Javier Regadera**, por la constante y entusiasta transmisión de sus conocimientos de la Histología y de la Patología Vascul ar durante la dirección de este estudio, y por su apoyo incondicional y su sincera amistad.*

*al Prof. Dr. **David Hardisson**, por sus valiosos consejos en la dirección de este estudio y por su apoyo académico.*

*al Lic. **Juan Pedro Velasco**, por sus altos conocimientos en los programas de análisis de imagen, su amable colaboración ha sido muy importante para mí.*

*al Dr. **Luis Alberto Condezo-Hoyos**, por su invaluable ayuda en el diseño de estudios de fractales y por el análisis estadístico de los casos.*

*a la Dra. **Inmaculada Santos Álvarez**, por su valiosa experiencia en la edición de textos médicos y por sus aportaciones y comentarios científicos durante la fase final de la elaboración de la presente monografía.*

*a mis compañeros y amigos **del Servicio de Angiología y Cirugía Vascul ar del Hospital Gregorio Marañón.***

DEDICATORIA:

*a mi mujer, **María** por compartir y dar sentido a toda mi vida*

*a mis hijos, **María y Guillermo** y
a mi nieta **Itziar**, por la felicidad de compartir con ellos tantas loables ilusiones*

INTRODUCCIÓN	1
INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA	2
<i>Clínica de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	2
<i>Patogénesis de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	4
<i>Ulceras Cutáneas Secundarias a la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	6
<i>Epidemiología de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	9
<i>Clasificación de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	11
<i>Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	14
<i>Hemodinámica y Fisiopatología de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	15
<i>Histología y Patología Molecular de la Insuficiencia Venosa Crónica</i>	17
ESTUDIO DE ANÁLISIS FRACTAL Y MULTIFRACTAL	19
FINALIDADES DEL ESTUDIO	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	25
MATERIAL	26
MÉTODOS	26
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	26
Fijación de las Piezas	26
<i>Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas</i>	26
<i>Método Inmunohistoquímico de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)</i>	27
<i>Métodos de Fluorescencia de fibras elásticas</i>	29
<i>Métodos de Cuantificación</i>	29
<i>Métodos de Estudio de Fractales</i>	32
<i>Métodos Estadísticos</i>	33
<i>Técnicas Fotográficas</i>	33
RESULTADOS	34
ALTERACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LA ÍNTIMA DE LA VENA SAFENA CON LESIONES VARICOSAS	35
CUANTIFICACIÓN HISTOMÉTRICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS	51
CUANTIFICACIÓN HISTOMÉTRICA DEL COLÁGENO IV	53
CUANTIFICACIÓN HISTOMÉTRICA DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS	55

ESTUDIO DE FRACTALES	57
<i>Número Fractal y Análisis Multifractal de Fibras Elásticas Orceína Positivas en Venas Normales y con Lesión Inicial, Moderada e Intensa Fibrosis Intimal</i>	59
<i>Análisis Fractales de la Autofluorescencia de Fibras Elásticas</i>	60
<i>Número Fractal y Análisis Multifractal de Fibras Elásticas Autofluorescentes en Venas Normales y con Lesión Inicial, Moderada e Intensa Fibrosis Intimal</i>	62
CORRELACIÓN DE LA DIMENSIÓN FRACTAL CON LA ALTURA INTIMAL Y CON LA PROPORCIÓN RELATIVA DE LA SUPERFICIE DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS INTIMALES RESPECTO AL ÁREA TOTAL INTIMAL	63
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	83
RESUMEN	85
SUMMARY	88
REFERENCIAS	91

INTRODUCCIÓN

INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA

La insuficiencia venosa crónica (IVC) en sus diferentes estadios es una patología crónica con elevada incidencia y prevalencia, que origina un alto coste económico. La IVC afecta principalmente a la extremidad inferior, pero puede ocurrir en otros territorios corporales. La pared venosa en pacientes con IVC sufre importantes cambios estructurales y funcionales.^{15,91}

Clínica de la Insuficiencia Venosa Crónica

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la IVC son dolor, pesadez y cansancio de las extremidades, asociándose en muchos casos calambres, sensación de quemazón, hinchazón, dilatación, lo que en ocasiones se ha confundido con el denominado “síndrome de las piernas inquietas”.⁷⁷ Durante la exploración clínica de las extremidades inferiores de los pacientes con IVC se pueden observar telangectasias, la presencia de venas reticulares, edema y la aparición de venas dilatadas y tortuosas. El término de venas varicosas procede del vocablo latino *varix* con lo que, desde las descripciones clásicas, se denominan varices a las venas superficiales elongadas y de morfología tortuosa.⁷⁷

En estadios más avanzados de la enfermedad, se producen cambios en la pigmentación de la piel -hiperpigmentación-, lipodermatoesclerosis, eczema, fibrosis subcutánea y finalmente ulceración; todas estas complicaciones reducen significativamente la calidad de vida de los pacientes;^{67,75,77,99,115,188-190,244} de hecho, la prevalencia del edema y de cambios en la piel, como hiperpigmentación y eczema debido a la IVC, varían entre el 3,0%⁵⁵ y el 11%⁶¹ de la población. Aproximadamente un 0,3% de la población en los países occidentales desarrollan úlceras venosas;^{7,17,59,139,145,168} mientras que la prevalencia de úlceras curadas es sólo del 1%;^{168,247} estos datos indican que el pronóstico de las úlceras venosas es malo y sólo un 50% cicatriza a los 4 meses,²¹⁶ de modo que en un 20% de estos casos la úlcera permanece abierta a los 2 años e incluso un 8% permanece abierta a los 5 años.⁴⁰ Se ha constatado que la completa recuperación de las úlceras venosas es más lenta en pacientes de bajo nivel socio-económico, solteros y especialmente en aquellos que no disponen de calefacción central en sus hogares.⁸³ Otros de los problemas socio-sanitarios

importantes en la enfermedad venosa crónica son la alta frecuencia de recidiva varicosa, con una tasa anual que varía entre el 6% y el 15% de los casos tratados quirúrgicamente.^{29,155}

Desde el punto de vista anatómico, el sistema venoso en la extremidad inferior puede ser dividido en tres sistemas: el sistema venoso profundo (SVP) que discurre en paralelo a los ejes arteriales y localizado intraaponeurótico, el sistema venoso superficial (SVS) que se sitúa entre la fascia muscular y la piel, salvo los dos tercios proximales de la vena safena menor, y en tercer lugar el sistema de las venas perforantes que atraviesan la fascia para conectar el SVP con el SVS.

La función del sistema venoso de las extremidades es conseguir un reservorio de sangre para regular el retorno sanguíneo hacia las cavidades cardíacas. En condiciones fisiológicas, el 90% de la sangre circula por el SVP y el 10% por el SVS. Las venas están expuestas a baja presión y, por ello, lógicamente están sometidas a menos mecanismos de estrés, en comparación con el sistema arterial de la extremidad; ello viene determinado, en parte, por el menor grosor de la pared muscular en las venas que en las arterias del mismo calibre.⁸

La función del sistema venoso periférico depende de una correcta capacidad funcional de las válvulas venosas y de una adecuada contracción de la capa muscular de la pared venosa, el cual ejerce un mecanismo de bomba retrograda que impele el flujo sanguíneo hacia el corazón.¹⁶⁶ El reflujo valvular puede preceder a la dilatación venosa²¹² y este fallo de las válvulas o de la pared muscular conduce a un incremento del estancamiento de la sangre, determinando un incremento de la presión venosa. Estas alteraciones desencadenarán, en primer lugar, un mecanismo de estrés en la propia pared y subsecuentemente alteraciones estructurales a lo largo de la vena, lo que desencadenará la formación de lesiones varicosas.⁸

Se han propuesto algunos factores de riesgo de la IVC, pero aún existe controversia acerca de la etiología y la patogénesis de la formación de varices en la extremidad inferior.⁷⁷ Normalmente las varices se suelen iniciar en las venas superficiales comunicadas con el SVP, especialmente en las uniones safeno-femoral y safeno-poplítea y en el sistema perforante, evidenciándose en estos casos incompetencia valvular.^{20,169} En la mayoría de los pacientes

con IVC se produce una incompetencia valvular a nivel de la unión safeno-femoral y, retrógradamente, una progresiva incompetencia valvular a todo lo largo de esta vena.¹⁴⁹ En algunos pacientes, sin embargo, la incompetencia puede comenzar en la unión safeno-poplítea.¹⁹⁴ En mujeres, algunas veces las varices presentes en el territorio safeno se asocian a reflujo venoso en la región pélvica, apareciendo varices vulvares durante o después de los embarazos.¹⁷⁰

Patogénesis de la Insuficiencia Venosa Crónica

Las teorías principales que se han establecido para explicar la patogénesis de la IVC primaria, esto es de la formación de venas varicosas, son dos: la hipótesis valvular por incompetencia valvular primaria¹⁵⁰ y la hipótesis de las alteraciones de la pared venosa.²⁰⁶ La teoría de la incompetencia valvular primaria fue introducida por Sir William Harvey en 1628, quien postuló que el desarrollo de las venas varicosas es una consecuencia de una incompetencia valvular, relacionada con una escasez o atrofia de las válvulas.⁷⁶

Está ampliamente establecido que la incompetencia del sistema venoso valvular es la causa más importante y más frecuente del desarrollo del reflujo retrógrado de venas varicosas en la extremidad inferior.^{91,228} Pero en la actualidad despierta un especial interés la valoración de la recurrencia de varices después de la flebectomía o de otros tratamientos médicos, dando especial relevancia a la incompetencia del sistema venoso perforante.¹⁷⁰ Con todo, aunque la incompetencia del sistema venoso perforante ha sido implicado como causa primaria de varices en la extremidad inferior, la relación de este sistema perforante con el sistema venoso profundo no ha sido completamente establecida y son escasas la investigaciones que aborden este problema. Algunos estudios han demostrado que las venas perforantes incompetentes tienen un diámetro superior al de las venas competentes,^{64,76,222,252} sugiriendo que, al igual que ocurre en las varices del sistema venoso profundo, el reflujo de las venas perforantes también pudiera desencadenar lesiones primarias que alterarían la integridad de la pared venosa. De hecho, el reflujo de las venas perforantes contribuye al incremento de la hipertensión del sistema venoso superficial, semejante a lo observado en los casos con reflujo en el sistema venoso profundo.⁷⁶ Ambos procesos -incompetencia vascular e hiperpresión- en el sistema venoso superficial de la

extremidades inferiores contribuyen a la dilatación y tortuosidad venosa características de la enfermedad varicosa.^{115,158,179,189}

Recientemente ha tomado especial relevancia la teoría que aboga por la existencia de lesiones primarias en la pared de las venas de pacientes con IVC, lesiones que pueden desarrollarse antes que ocurran una incompetencia valvular secundaria,^{68,76,92} tal como se ha demostrado en pacientes con enfermedad varicosa en las extremidades inferiores en los que no se evidencia una incompetencia valvular.^{56,249} Además, estos datos clínicos han sido corroborados por estudios histopatológicos, en los cuales se han descrito anomalías en la arquitectura de la pared venosa que preceden al desarrollo de la incompetencia valvular y subsecuente a la formación de varices. De hecho, la enfermedad varicosa no es una lesión exclusiva de la extremidad inferior, ya que en algunos pacientes con varices en las extremidades inferiores también se han encontrado cambios patológicos iniciales en las venas de antebrazos;^{157,234,235} y dado que en estos casos la distensibilidad de las venas braquiales en pacientes con varices está incrementada, se ha sugerido que la enfermedad varicosa es una enfermedad sistémica de la pared venosa.²⁵³ En este sentido, se sabe que las válvulas son estructuras capaces de resistir presiones de 200mm Hg sin fugas o cambios degenerativos; por ello, es verosímil sugerir que las varices puedan ser el resultado de una degeneración de la pared venosa en determinados segmentos intervalvulares, dispuestos entre válvulas completamente competentes.⁷⁶

En la enfermedad varicosa primaria, el reflujo retrogrado surge en vasos venosos incompetentes, formándose un gradiente de presión entre dos polos: en el polo mayor del gradiente de presión, la fuente del reflujo se encuentra en la vena iliaca-femoral-poplítea, y en el polo menor, el punto de reentrada descansa en las venas profundas de la pierna.¹⁹⁴ En definitiva, en relación con la etiopatogenia de la enfermedad varicosa, cada día existen mayores evidencias que apoyan la hipótesis de que la dilatación venosa precede al reflujo venoso, y que la disfunción valvular puede ser un epifenómeno de la dilatación de la pared venosa.^{147,191}

Úlceras Cutáneas Secundarias a la Insuficiencia Venosa Crónica

El desarrollo de alteraciones de la microcirculación cutánea, así como la asociación de enfermedad trombo-embólica y flebitis, también tienen una gran importancia clínica en los pacientes con varices en la extremidad inferior.³² Las úlceras cutáneas en los pacientes con IVC son muy frecuentes y se atribuyen a una hipertensión venosa producida por una incompetencia valvular venosa, o por una obstrucción venosa, o por una combinación de ambas. En la IVC, la circulación capilar se encuentra normalmente reducida, provocando cambios en la piel, que incluyen el desarrollo de eczema y ulceraciones.⁷⁴ Cuando la IVC es leve, las alteraciones en los capilares de la piel son poco importantes; contrariamente, en los pacientes con insuficiencia de las venas perforantes o del sistema venoso profundo, las lesiones cutáneas como resultado del aumento de flujo de la microcirculación son muy evidentes, sobre todo la hiperpigmentación y la lipodermatosclerosis, de modo que en estos pacientes los capilares son elongados y tortuosos y están marcadamente dilatados.¹⁷⁰ Se sabe que el bajo drenaje venoso y la hipertensión venosa incrementa la presión transmural en las venas postcapilares, produciéndose la exudación de fluidos y el edema tisular, lo que favorece el desarrollo de inflamación, infección, trombosis, necrosis, ulceración y lipodermatoesclerosis.^{26,30,70} En las zonas de úlceras cutáneas secundarias a la IVC se puede producir posteriormente un tejido de granulación, con el desarrollo de diferentes mecanismos celulares y moleculares que favorecen los procesos de angiogénesis, semejantes a los descritos en otros procesos inflamatorios y tumorales.²⁰⁴

Las úlceras cutáneas crónicas, incluyendo las úlceras venosas, las úlceras diabéticas, las isquémicas y las secundarias a quemaduras, en la actualidad representan un gran problema clínico, social y económico.¹⁰² En los EEUU se estima que cada año más de 8 millones de pacientes desarrollan úlceras que evolucionan hacia la cronicidad.^{100,180} En pacientes con IVC; de hecho, el riesgo de desarrollar una ulceración venosa crónica es aproximadamente del 1% y la incidencia de cambios isquémicos en la piel es de un 10%.^{156,163,171} Entre los factores etiológicos que favorecen el desarrollo de úlceras crónicas destacan la neuropatía en pacientes diabéticos¹⁸⁷ y el reflujo venoso en los pacientes varicosos.¹³² Con todo, es menester hacer constar que en el caso concreto de las úlceras venosas, la causa de la

isquemia microvascular no está determinada por un único factor, sino que, en su origen y evolución hacia la cronicidad están involucrados múltiples factores.³⁸

En la formación de úlceras venosas, la microangiopatía de los vasos sanguíneos y linfáticos desempeña una importante función en la fisiopatología de los cambios cutáneos isquémicos.^{27,29} Los estudios de capilaroscopia en la piel de pacientes con IVC han descrito la formación de un “halo” alrededor de los capilares dilatados, el cual es el resultado del microedema y del depósito de fibrina pericapilar, lo que posiblemente impide la normal nutrición de las células y tejidos cutáneos.¹⁷⁰ Recientemente se ha descrito la presencia de acumulaciones de leucocitos en la piel de las piernas en pacientes con IVC,²²⁷ lo cual sugiere el desencadenamiento de mecanismos de activación leucocitaria^{219,246} y de adhesión al endotelio capilar,²³⁸ mediada, entre otras moléculas, por ICAM 1.²⁴³ Pero además, en los pacientes con IVC también se ha comprobado una verdadera microangiopatía linfática, que contribuiría a la formación del edema.⁸⁵ Está claro que en la formación de las úlceras venosas intervienen cambios hemodinámicos que determinan una isquemia tisular progresiva, apareciendo edema, tumefacción y ulterior ulceración en la piel. Además clínicamente es un hecho corroborado que en los bordes cutáneos de la ulceración ocurre también un linfedema y cambios en la circulación de retorno linfático. Con todo, las interrelaciones de la microangiopatía sanguínea y linfática en el desarrollo de úlceras venosas cutáneas aún están por dilucidar y requiere nuevas investigaciones fisiológicas y moleculares,⁵² así como estudios centrados en la posible interrelación de mecanismos implicados en la regulación hemodinámica sanguínea conjuntamente con las alteraciones de la circulación linfática de retorno, los cuales pueden estar relacionados con complicaciones de las varices de la extremidad inferior.²²⁴

Asimismo, en la patogénesis de los cambios microangiopáticos cutáneos presentes en los pacientes con IVC están implicados mecanismos relacionados con alteraciones de la fibrinolisis, dado que se han encontrado depósitos de agregados de fibrinógeno, fibrina y hematíes.^{138,170} Desde las primeras observaciones de ulceraciones cutáneas secundarias a la enfermedad varicosa,³⁴ se encontró un incremento de los niveles de fibrinógeno sanguíneo en los pacientes con IVC, estando elevado el índice de degradación de fibrinógeno,

especialmente en pacientes con úlceras.⁸⁰ La cantidad y el transporte incrementado de fibrinógeno, debido a la hipertensión venosa, la elevada permeabilidad endotelial, así como la pérdida de plasma en los pacientes con IVC fue significativamente mayor que en los sujetos normales. Por lo tanto, se ha demostrado que esta disminución de la fibrinolisis determina el desarrollo de una hiperfibrinogenia.^{25,170} Además, se sabe que la hipertensión venosa en la extremidad inferior provoca un aumento del tamaño del capilar y un ensanchamiento de los poros endoteliales, lo cual produciría una mayor pérdida de fibrinógeno y su ulterior polimerización para formar fibrina.²⁴³

La severidad de la microangiopatía en pacientes con IVC es, sin duda, lo que determinará la extensión de las alteraciones tróficas en la piel. Pero además, como resultado de la incompetencia valvular en el sistema profundo y/o de las venas perforantes y la ulterior obstrucción del flujo venoso causado por la trombosis venosa, el incremento en la presión venosa ambulatoria (periférica) se transmitirá retrógradamente a la microvasculatura cutánea de la porción distal de la extremidad inferior, fundamentalmente en la región del tobillo, lo que explicaría la mayor incidencia de ulceraciones en la porción distal de la extremidad inferior,^{85,113,183} determinando en muchos casos lesiones tróficas irreversibles en la piel y tejidos blandos, que exigen la amputación de la extremidad. Con el fin de evitar la evolución tórpida de las úlceras varicosas, en la actualidad se están investigando, como dianas terapéuticas, nuevas moléculas que producen un aumento del factor de crecimiento TGF-beta, el cual tiene efectos proliferativos y antiinflamatorios y que su utilización parece ser que obtiene mejores resultados en la evolución de las úlceras venosas.⁹⁰

Por último, en relación con las trombosis venosa profunda (TVP) en la extremidad inferior, una historia previa de TVP incrementa las posibilidades de desarrollar IVC en un 25,7%. Así mismo, las lesiones fibrosas en la pared venosa pueden aparecer como cambios secundarios debidos a trombosis venosas previas, lo que pueden dar lugar a reflujo y/o obstrucción propios de la enfermedad varicosa.^{121,165,170,185} De otra parte, en algunos casos de IVC las alteraciones hemodinámicas secundarias a la enfermedad varicosa de larga duración determinan el desarrollo de un síndrome postrombótico.^{4,60,142,233} De hecho,

pacientes con obstrucción crónica y reflujo venoso tiene una mayor incidencia de sufrir una trombosis capilar, lo cual determina una menor presión de O₂ transcutánea, seguida de isquemia y ulceración de la piel. Pero además se sabe que después de una enfermedad tromboembólica sistémica^{200,221} o de un tromboembolismo venoso local se pueden producir varices secundarias, con recanalización e incompetencia valvular en el sistema venoso profundo o en las venas perforantes, lo que complicaría la evolución de estos pacientes.^{61,68,143,144,152,176,237}

En conclusión, en los pacientes con IVC la disfunción venosa se asocia con una disminución del flujo sanguíneo, determinado un éxtasis de la sangre en los segmentos periféricos de las venas, lo cual provoca un incremento de la presión venosa y la dilatación de la pared vascular. La tensión venosa y la hipoxia activan a las células de la pared venosa, incluidos los mecanismos de ROS secundarios al daño endotelial^{54,129} (tal como previamente han sido publicados también en patología del endotelio arterial^{3,5}) y estos procesos de estrés oxidativo determinan la migración leucocitaria en la pared vascular, cerrando el círculo fisiopatológico de la formación de las lesiones venosas y cutáneas presentes en los pacientes con varices de la extremidad inferior.⁹⁸

Epidemiología de la Insuficiencia Venosa Crónica

La enfermedad venosa crónica y sus complicaciones, que incluye la IVC y el desarrollo de úlceras venosas en la piel tiene un gran impacto socio-sanitario en los países desarrollados.^{148,236} Se estima que la IVC está presente en el 10-40% de la población con edad comprendida entre 30 y 70 años.⁹² Las varices constituyen la principal enfermedad vascular y afectan a más de 25 millones de la población adulta de los Estados Unidos de Norteamérica,¹⁹¹ y de ellos, más de 7 millones de personas desarrollan una IVC, la cual representa la patología subyacente causante de entre el 70 y el 90% de todas las úlceras venosas;⁴¹ es más, el *American Venous Forum* estima que una persona de cada 1.000 presenta una úlcera venosa sin curar.¹⁰⁴ Estudios poblacionales llevados a cabo en Australia y en el Reino Unido indican que las úlceras venosas tienen una prevalencia similar en ambos países.^{18,59} Considerando en particular a la población europea, las venas varicosas es una patología común que afecta al 30-40% de todos los adultos.⁵⁸

La incidencia anual de venas varicosas descrita en el *Framingham Study* es del 2,6% en mujeres y del 1,9% en varones,³¹ y su prevalencia, según múltiples estudios clínicos, es el doble en mujeres que en hombres^{73,137,215,223} y se incrementa con el envejecimiento,³⁹ tal como se ha constatado también en diversos estudios de metaanálisis.³⁹ La prevalencia de la enfermedad varicosa, aunque varía según las diferentes publicaciones, en los países occidentales, en la población de pacientes mayores de 15 años, es del 10-15% para hombres y del 20-25% para mujeres,^{1,81} dando otros autores valores por encima del 35% en mujeres y del 28% en hombres.⁷³ La mayor incidencia de la IVC en mujeres puede relacionarse, en parte, con los embarazos y con el desarrollo de varices vulvares durante y después del embarazo;⁹⁷ de hecho, el desarrollo de nuevas varices ocurre en el 28% de los embarazos.²²⁰ Es posible que los distintos niveles de hormonas sexuales entre hombres y mujeres influyan en la distinta prevalencia de la enfermedad; de hecho, los niveles de estradiol fueron significativamente mayores en la extremidad inferior que en la extremidad superior en el subgrupo de pacientes con incompetencia venosa pélvica.¹⁴ La evidencia clínica demuestra que mujeres con niveles altos de estradiol en suero tienen una mayor incidencia de presentar venas varicosas. Sin embargo, en hombres la relación entre los esteroides sexuales séricos y el desarrollo de venas varicosas no está tan clara;¹¹⁹ con todo, en un estudio en hombres con varices y reflujo en la vena safena mayor se han encontrado valores superiores de estradiol y testosterona que en las venas del brazo.¹¹⁹ Estos datos también apoyarían una posible relación causal entre los esteroides sexuales del varón y el desarrollo de varices.¹¹⁹

En los países desarrollados se estima que los sistemas de salud pública dedican entre el 1 y el 3% del presupuesto sanitario al diagnóstico y tratamiento de la IVC.⁷⁹ En Alemania, Francia y el Reino Unido se estima que el coste total de la IVC a la sociedad, ya sea directa o indirectamente, es de más de 1.000 millones de dólares.¹³⁴ Asimismo, el coste anual estimado solo para el Reino Unido es de 400 a 600 millones de libras¹⁰⁹ y de 1.000 millones de dólares para los Estados Unidos de Norteamérica.¹⁰⁵ En definitiva, la IVC tiene un gran impacto económico en los países occidentales, debido a su alta prevalencia, el elevado coste de los tratamientos, sin olvidarnos del gasto en investigación, y también por la pérdida de días de trabajo de estos pacientes crónicos.¹³⁰

La enfermedad venosa es una patología con un cierto componente genético^{79,207} y numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la influencia de factores hereditarios en el desarrollo de varices^{58,81} Entre los factores de riesgo identificados cabe destacar la edad, el sexo, la historia familiar, la maternidad y el trabajo durante muchas horas en bípedastación.^{128,137} El componente genético en la enfermedad venosa es de aproximadamente del 17%,⁷⁹ existiendo un alto riesgo de que los hijos de pacientes con IVC desarrollen en un futuro varices de la extremidad inferior;^{58,193} de hecho se ha publicado que el riesgo de desarrollar venas varicosas es de un 20% si ninguno de los dos padres las sufrieron, un 25-62% si uno de los dos padres estaba afectado y de un 90% si los ambos padres tenían venas varicosas, concluyéndose que la herencia es el factor principal del desarrollo de venas varicosas.⁵⁸

Estudios epidemiológicos han demostrado que la incidencia de úlceras cutáneas de origen venoso se incrementa con la edad y además la presencia de úlceras cutáneas se asocia con la existencia de obesidad, diabetes, insuficiencia cardiaca, hipertensión, enfermedad renal y artritis reumatoide.^{59,168} La obesidad es, sin duda, un factor de riesgo de la IVC⁶² y concretamente el índice de masa corporal es un factor de riesgo más importante en mujeres que en hombres.^{62,82,136} En los pacientes con un elevado índice de masa corporal, el tamaño de pared venosa es mayor, el diámetro relajado está aumentado (*resting diameter larger*), y los cambios en el diámetro del vaso son mayores después de la maniobra de Valsalva.^{111,136} Se ha descrito que más del 50% de pacientes con IVC han sufrido previamente alguna clase de lesión grave en la pierna, incluidas fracturas, quemaduras, aplastamientos y traumatismos penetrantes;^{59,167,213,248} además la historia clínica revela que el 45% de los pacientes con IVC han sufrido flebitis superficial.²¹³

Clasificación de la Insuficiencia Venosa Crónica

La clasificación de la IVC fue introducida en 1995 por el consenso de un Comité Internacional, en base a los datos aportados por la clínica (C), la etiopatogenia (E), la anatomía patológica (A) y la fisiopatología (P, del inglés *pathophysiology*), surgiendo así la clasificación CEAP, la cual ha sido rápidamente aceptada como sistema de clasificación estándar de aplicación en todos los pacientes con IVC.¹²² La clasificación CEAP distribuye a

los pacientes en 7 categorías clínicas (C0 a C6), y está basada en el incremento de la gravedad de los signos y síntomas de la enfermedad, los cuales son importantes para evaluar la probabilidad del futuro desarrollo de una úlcera cutánea.¹⁹²

Tabla 1. Clasificación CEAP enfermedad venosa.

CLASIFICACIÓN CEAP DE LA ENFERMEDAD VENOSA
CLÍNICA (C)
0 (Sin enfermedad)
1 (Telangiectasias)
2 (Venas Varicosas)
3 (Edema)
4 (Lipodermatoesclerosis o hiperpigmentación)
5 (Úlcera cicatrizada)
6 (ulcera activa)
ETIOLÓGICA (E)
Congénita (Presente desde el nacimiento)=Ec
Primaria (Indeterminada)=Ep
Secundaria (Pos-trombótica o postraumática)=Es
ANATÓMICA (A)
Superficial (Safena >, safena <)=As
Profunda (Cava, ilíacas, gonadal, femoral, poplítea, tibial, etc)=Ad
Perforantes (Muslo y pierna)=Ap
PATOFISIOLÓGICA (P)
Reflujo (Axial y de venas perforantes)=Pr
Obstrucción (Aguda, crónica)=Po
Combinación de ambas (Disfunción valvular y trombosis)=Pro

En cada paciente se debe realizar una clasificación clínica CEAP antes y después del tratamiento. Cuando el paciente después del tratamiento alcanza una puntuación CEAP inferior a la obtenida en el momento del diagnóstico se puede constatar una mejoría

clínica;¹⁷⁰ la clasificación CEAP es, por tanto, el método más exacto y discriminatorio de la evaluación del estado clínico del paciente con enfermedad varicosa y del grado de satisfacción con el tratamiento efectuado.^{159,236} Aunque es cierto que algunos componentes clínicos de la clasificación CEAP, como los grados C5 (úlceras cicatrizadas) y C4 (lipodermatoesclerosis o hiperpigmentación), son imposibles de cambiar o se resuelven muy lentamente después de una intervención quirúrgica adecuada.¹⁹²

El desarrollo de la IVC, así como el incremento de la gravedad de los signos y síntomas, aumentan con la edad de los pacientes, existiendo una asociación estadística entre un alto grado CEAP y una elevada edad de los pacientes.⁷⁹ Además, aquellos pacientes que sólo presentan varices sin otras complicaciones (C2) sufren los primeros síntomas con una media de edad de 35,8 años, mientras que en aquellos pacientes con IVC de mayor intensidad (desde C3 a C5 o C6) los primeros síntomas aparecen antes, con una media de edad de 30,7 años.⁷⁹ Otros estudios están bastante de acuerdo con estos datos y con el valor predictivo de la clasificación CEAP, puesto que han constatado un considerable incremento en la duración de la enfermedad y de la severidad, dependiendo de la edad de la aparición de la enfermedad varicosa, iniciándose a los 20,1 años en el grupo C2, a los 23,4 y 25,3 años respectivamente para los grupos C3 y C4 y a los 29,8 para C5 o C6.

La clasificación CEAP permanece como un pilar fundamental en el diagnóstico y en el tratamiento de la enfermedad varicosa; no obstante, existen algunas diferencias entre las manifestaciones clínicas y los hallazgos histopatológicos.¹⁶² La correlación más fuerte entre la clasificación CEAP y el estadio histopatológico se encontró en aquellos pacientes en los que la exploración clínica demostró venas varicosas, pero que no referían historia clínica previa de enfermedad, mientras que la correlación más débil fue en los casos de pacientes con enfermedad varicosa en una sola extremidad inferior.¹⁶² La descripción histológica y la terminología empleada en los informes anatomopatológicos de las venas varicosas han sido en general poco precisos, no obstante se ha mencionado que pacientes en estadio CEAP C5 o C6 presentan un grado II o III de lesión histopatológica, incluso se ha descrito que algunos pacientes con grado CEAP C6 presenta grandes masas fibrosas con calcificaciones de la pared venosa.¹⁷⁴

Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Venosa Crónica

Para establecer un diagnóstico de IVC es necesario realizar una historia clínica y una exploración minuciosa, completada con exploraciones no invasivas como el eco-doppler, considerada la prueba de referencia en la actualidad.⁸⁶ En la exploración clínica, la primera prueba que se hace para la valoración de la función valvular venosa es la maniobra de Valsalva. Cuando las válvulas venosas son competentes, el reflujo post-Valsalva es corto y limitado y, contrariamente, un reflujo largo y pronunciado es diagnóstico de incompetencia valvular.^{108,110,154,157} Cambios relativos en el diámetro venoso durante la maniobra de Valsalva es significativamente mayor, tanto en las venas superficiales como en las profundas de pacientes con IVC, comparando con el grupo control de sujetos con venas normales; además, esta capacidad de distensión incrementada se correlaciona con el grado de reflujo venoso en los pacientes varicosos.¹¹¹ La diferencia de presión que existe entre la vena femoral y el resto de la sangre remanente después de una ligadura puede activar el proceso de creación de nuevos canales de comunicación vascular, con la consecuencia de reflujo recurrente y la recidiva de las varices.¹⁹³

El desarrollo de métodos diagnósticos no invasivos, incluidos el laser Doppler,^{21,213} la medida de la presión parcial de O₂ transcutánea⁸⁴ o el empleo de microlinfografía,²⁸ son de gran ayuda para el estudio de la extensión y de los cambios en la microcirculación de la piel de las extremidades en los pacientes con IVC. En casos de diagnóstico controvertido o en pacientes con compresiones extrínsecas, la Venografía por Tomografía Computarizada (VTC) proporciona una excelente ayuda para establecer los procedimientos quirúrgicos más adecuados;¹⁶¹ sin embargo en la actualidad se ha constatado que la VTC no puede reemplazar al eco-doppler, debido a la desventaja de la alta dosis de radiación recibida por el paciente,^{198,220} aunque las excelentes imágenes en 3D obtenidas con VTC son muy útiles para diseñar la operación, así como para su aplicación en investigación y docencia.¹⁶¹

El principal tratamiento quirúrgico de la IVC sigue siendo la ligadura safeno-femoral y la safenectomía unida a la flebectomía de las colaterales,¹¹⁶ aunque los casos de recidiva puede ocurrir hasta en el 40% de los pacientes.²³⁵ Se ha demostrado que la ligadura safeno-femoral en pacientes con insuficiencia en la vena safena mayor mejora la función

vasodilatadora cutánea y reduce el riesgo de ulceración venosa (independiente del estado de afectación funcional del endotelio) sobre todo alrededor del tobillo.¹²⁵ Sin embargo, el 90% de las varices recidivantes están asociadas a incompetencia recurrente en la unión safeno-femoral previamente ligada.²³⁵ El tratamiento quirúrgico de estas varices recidivantes implica la extirpación del territorio venoso del reflujo, desde el sistema venoso profundo al sistema venoso superficial.¹⁸² La principal signo que identifica una recidiva es la presencia de neovascularización -la neoangiogénesis- en el segmento venoso ligado,^{87,89,120,124,225,226} lo que indica la reconexión de ambos sistemas venosos.²²⁰ De otra parte, se han publicado otras causas de recidivas postquirúrgicas de la enfermedad varicosa, como son el desarrollo de incompetencia venosa perforante, la presencia de un reflujo venoso accesorio o de una inadecuada cirugía primaria; con todo, sin duda, la neovascularización es la causa más común de recidiva.²²⁵

Con el fin de prevenir la ulterior neovascularización después de la cirugía, se ha propuesto usar barreras mecánicas en el foco angiogenico (procedimiento originariamente empleado en la degeneración macular asociada a la edad).^{87,225} En este sentido, en pacientes en los que se ha realizado una flebectomia, la supresión de la neovascularización se ha conseguido introduciendo una membrana de politetrafluoroetileno en la unión safeno-femoral, mejorando a largo plazo los resultados de la cirugía venosa.²²⁵

Por último, es bien conocido que la cirugía endovascular ha tenido un importante desarrollo en los últimos años, fundamentalmente en diferentes patologías que cursan con obstrucción de la luz arterial, pero también métodos endovasculares se están usando recientemente con muy buenos resultados para el tratamiento de las lesiones de tromboembolismo en la vena safena de paciente con IVC.²³

Hemodinámica y Fisiopatología de la Insuficiencia Venosa Crónica

Está completamente establecido que las diferencias de presiones juegan un importante papel en la circulación arterial y venosa. Se sabe que la capacidad elástica de los grandes vasos permite almacenar grandes volúmenes de sangre en condiciones fisiológicas. Aún así, la exposición a grandes presiones provoca una modificación de las propiedades

estructurales y funcionales de los vasos; de hecho, un incremento de la tensión en la pared vascular determina cambios en el remodelado vascular, lo cual está demostrado en casos de hipertensión y arteriosclerosis; sin embargo, el efecto de estas fuerzas biomecánicas en el remodelado de la pared venosa no está claramente dilucidado.^{77,172} La presión hidrostática en las venas de la extremidad inferior en posición bípeda es igual a la altura de la columna de sangre entre la aurícula derecha y el punto donde se realice la medida, considerándose hipertensión venosa cuando se alcanza un valor medio de 90 mm de Hg, tomando los datos a la altura del tobillo.¹⁹⁴ Esta presión hidrostática es igual en las venas superficiales que en las profundas, cuando la determinación se realiza en el mismo nivel hidrostático; por ello, no existe reflujo en bipedestación gracias a la perfecta función de los músculos de la pantorrilla.⁴⁹ Es más, durante la actividad física, los músculos de la pantorrilla actúan como una bomba, de modo que en posición bípeda la presión hidrostática venosa disminuye significativamente en las venas de la pierna y del pie, alcanzando al nivel del tobillo un descenso de aproximadamente 20 mm de Hg. Contrariamente, la presión en las venas poplíteas y femorales presenta pequeños aumentos y disminuciones durante la actividad de bombeo de los músculos de la pantorrilla; sin embargo, la presión media no disminuye y permanece al mismo nivel que en posición bípeda estática. De esta forma surge un potencial para el desarrollo de un flujo retrogrado.¹⁹⁴ En relación con estos hechos, recientemente se ha propuesto el concepto de gradiente de presión venosa ambulatoria,¹⁹⁵ definido por la diferencia de presión de $37,4 \pm 6,4$ mm Hg entre la vena femoral y las venas de la pierna. La diferencia de presión entre la vena femoral y las venas de la pierna aumenta durante el momento de tensión/esfuerzo (presión de estrés, maniobra de Valsalva), por lo que se incrementa la presión en la vena femoral sobre el valor hidrostático.¹⁹⁴

En individuos normales, la presión venosa en bipedestación, tomada a la altura del tobillo en individuos normales (estatura media de 178 cm) es de 90 a 100 mm Hg. Durante la contracción de los músculos de la pantorrilla, la presión venosa disminuye hasta valores de 20-30 mm Hg, seguido de un rápido relleno venoso. En pacientes con reflujo venoso no muy marcado, durante la contracción de los músculos de la pantorrilla, la caída de la presión es inferior al 50%.⁶⁷ Por consiguiente, una presión generada de 83,4 mm Hg en estado basal se asemeja a la observada en las venas de la extremidad inferior en posición bípeda.¹⁹¹ Aunque

en las venas perforantes varicosas con disfunción valvular, la presencia de altas presiones (por encima de 250 mm Hg) en las venas profundas se transmiten a las venas superficiales, debido a las contracciones musculares. En estos casos, el incremento de la tensión basal a 83,4 mm Hg puede causar adicionalmente una reducción significativa e irreversible de la capacidad contráctil de la vena cava inferior, sugiriendo cambios estructurales y daño irreversible en su pared.¹⁹¹ En definitiva, el grado de disfunción de los músculos de la pierna para bombear la sangre determina la extensión anatómica de las varices de la extremidad inferior y la severidad de la obstrucción y del reflujo,^{42,170,194} siendo la aparición de hipertensión venosa la consecuencia hemodinámica del reflujo venoso.¹⁹⁴

En la enfermedad varicosa primaria, la región en la que más frecuentemente se desarrolla el reflujo es la unión safeno-femoral y la safeno-poplítea, de modo que el reflujo determina un desvío de la sangre venosas desde el muslo a la pierna.¹⁹⁴ En general, la degeneración de las venas periféricas comienza con una dilatación de la luz vascular y un cierre insuficiente de las válvulas, determinado el reflujo sanguíneo desde el sistema venoso profundo hacia el sistema venoso superficial;¹⁹⁴ se desarrolla, pues, una “hipertensión ambulatoria en el sistema venoso superficial” y la recirculación de grandes cantidades de sangre que se acumulan en la pierna afectada.²²

Histología y Patología Molecular de la Insuficiencia Venosa Crónica

Aunque los mecanismos fisiopatológicos y los cambios íntimos moleculares de la pared de las venas varicosas aún no son concluyentes, lo que está claro es que las anomalías en la pared venosa y/o en las válvulas están consideradas como las principales causas del desarrollo de varices en la extremidad inferior. Estudios histológicos y moleculares han confirmado que en la pared de las venas varicosas, cuando se comparan con lo observado en las venas normales, existen cambios importantes en el contenido y la distribución de colágeno, fibras elásticas y células musculares lisas,^{66,170,186,209,231} incluso sin que exista incompetencia de la válvula de la unión safeno-femoral.⁶⁹ En relación con los mecanismo involucrados en el fallo valvular de venas varicosas primarias, es posible que exista una síntesis anormal de colágeno, lo cual pudiera determinar un debilitamiento y expansión del anillo valvular, provocando una aposición defectuosa entre las válvulas y,

subsecuentemente, el reflujo venoso.⁷⁶ También en los segmentos venosos con lesiones varicosas se han encontrado alteraciones en las metaloproteinasas o cambios morfológicos de las células musculares lisas de la pared venosa (hipertrofia o muerte celular³⁷) y alteraciones de la elastina, pero los datos publicados son aún muy contradictorios.^{44,69,117,177,217,229}

Especial relevancia tienen las investigaciones acerca de la actividad contráctil del músculo liso de la vena safena, lo cual es fundamental para mantener el tono característico de la pared venosa;⁸⁰ de hecho, el grado de distensión de la pared venosa está controlado por las células musculares lisas y por la cantidad de colágeno y de elastina. También el tono pasivo está determinado principalmente por la cantidad y organización del colágeno y de la elastina, y la pérdida de tono en las venas varicosas puede deberse a alteraciones de estos componentes de su pared venosa.²³¹ Si bien en la regulación del tono vascular de las venas de la extremidad inferior es fundamental la actividad contráctil de las células musculares lisas de la túnica media, es muy importante considerar en la regulación del tono vascular la participación del sistema nervioso autónomo.⁶⁹ En este sentido, se ha descrito una reducción de la contracción de la pared venosa en respuesta a noradrenalina, lo que también sugieren una evidente alteración de la respuesta contráctil del músculo liso;¹³ además, en la patogénesis de las varices se han involucrado moléculas que regulan la relajación vascular, incluida la denominada forrelaxin-2.²

En relación con la patogénesis de la enfermedad varicosa, numerosos estudios han demostrado la importancia local del endotelio venoso, y concretamente de la secreción de endotelinas, en el mantenimiento del tono vascular y de la presión sanguínea en individuos normales y en pacientes con enfermedad varicosa.¹³³ En el desarrollo de las venas varicosas, si bien está completamente reconocido la importancia de una capacidad contráctil reducida y de cambios de elasticidad de la pared venosa,¹⁷⁴ es necesario hacer constar que estos cambios no deben considerarse como una alteración primaria y general de todas las células musculares lisas de las venas, puesto que las varicosidades se encuentran de forma localizada, apareciendo en múltiples segmentos a lo largo de la vena afectada.²²⁹

El incremento de la tensión sobre la pared venosa generada por la presión intraluminal determina cambios en el grosor y en la composición de la pared venosa;^{135,253} de modo que en las venas varicosas, la elongación mecánica ejercida por el incremento de la presión intraluminal puede inducir la hiperplasia e hipertrofia del músculo liso vascular y alteraciones de su capacidad contráctil, así como cambios de las fibras elásticas, de la distribución de los diferentes tipos de colágeno y de las proteínas de la matriz extracelular.^{106,140,141}

En relación con la elasticidad de la pared venosa, se ha descrito que una alteración histológica o molecular de las fibras elásticas, tal como se ha demostrado en la piel,²⁰³ podría estar implicada en los mecanismos de remodelación que sufre la pared venosa en los segmentos varicosos.^{46,186} Se ha demostrado que la elasticidad de la pared venosa en la extremidad inferior está reducida, tanto en pacientes con IVC, como en aquellos pacientes del grupo control que tiene factores de riesgo de desarrollar varices⁵⁰ y también en los hijos aparentemente sanos de pacientes con venas varicosas;¹⁹³ todos estos datos sugieren la existencia de un componente genético en relación con la enfermedad varicosa.²⁰⁹

ESTUDIO DE ANÁLISIS FRACTAL Y MULTIFRACTAL

La aplicación de modelos matemáticos del análisis fractal en la evaluación de estructuras complejas e irregulares, tan frecuentes en las imágenes biomédicas, actualmente han recobrado una gran importancia.^{33,47} Los fractales son figuras, espaciales o planas, formada por componentes infinitos (*fractus*, fragmentos), cuya apariencia y la manera en que se distribuyen no cambian aunque se modifique la escala empleada en la observación. Los fractales son, por lo tanto, elementos calificados como semi-geométricos (por su irregularidad no pertenecen a la geometría tradicional) que disponen de una estructura esencial que se reitera a distintas escalas. Los fractales pueden presentar tres clases diferentes de autosimilitud, lo que significa que las partes tienen la misma estructura que el conjunto total: a) autosimilitud exacta, el fractal resulta idéntico a cualquier escala; b) cuasi-autosimilitud, con el cambio de escala, las copias del conjunto son muy semejantes, pero no idénticas; c) autosimilitud estadística, el fractal debe tener dimensiones estadísticas o de número que se conserven con la variación de la escala.¹⁴⁶

La geometría clásica no es lo suficientemente amplia para abarcar los conceptos necesarios para medir las diferentes formas fractales. Si tenemos en cuenta que se tratan de elementos cuyo tamaño cambia incesantemente, no es fácil, por ejemplo, calcular su longitud. La razón es que si se intenta realizar una medición de una línea fractal utilizando una unidad tradicional, existirán siempre componentes tan pequeños y delgados que no podrán ser delimitados con precisión. Es por eso que se ha creado el concepto de dimensión fractal que permite, cuando hablamos de líneas fractales, conocer de qué manera o en qué grado éstas ocupan una porción de plano. En relación con la geometría tradicional, un segmento posee dimensión uno, un círculo, dos, y una esfera, tres. Dado que una línea fractal no abarca toda la porción del plano, debería tener una dimensión que no llegue a dos. El método más común para cuantificar la dimensión fractal es el método denominado de *box-counting*: la imagen binaria es superpuesta a una caja de mallas y el número de cajas $N(\epsilon)$ a una escala ϵ son relacionadas mediante el denominado *ploteo log-log*, la pendiente de dichos datos es definido como la dimensión fractal (D_c).^{95,96,146}

La geometría fractal es una herramienta poderosa para la caracterización de imágenes discontinuas, complejas, heterogéneas y fragmentadas de los sistemas biológicos.¹⁹⁹ La geometría fractal ha sido aplicada para medir las irregularidades de muestras biológicas tales como lesiones malignas, angiogénesis y para medir la distribución de la matriz extracelular en arterias;⁶⁵ también se han realizado estudios de análisis multifractal en la evaluación del electrocardiograma.¹⁶⁰ En este sentido, el análisis morfológico empleando un enfoque fractal es una de las áreas más prometedoras para describir de manera objetiva distintos cambios observados en diversas patologías.¹⁴⁶

El análisis fractal y multifractal ha sido aplicado con éxito al estudio de las alteraciones vasculares de la elastina en la capa media de arterias¹⁶ y también en la morfología microvascular y en los mecanismos de remodelación vascular,^{95,96,112} hipertensión pulmonar¹⁰¹ y para estudiar el ciclo cardíaco en enfermedades cardiovasculares.¹⁶⁴ Recientemente, se ha realizado un análisis cuantitativo de los cambios estructurales que sufren la elastina y el colágeno, usando una combinación de la transformación en dos dimensiones de Fourier y el análisis fractal.⁴⁸ Aunque la dimensión fractal permite capturar

la complejidad vascular,¹⁹⁹ en nuestro conocimiento no existe ningún estudio en el que se haya aplicado el análisis fractal y/o mutifractal en pacientes con IVC, tanto para precisar diferentes estadios patológicos, como para caracterizar la evolución de la IVC.

FINALIDADES DEL ESTUDIO

Estudios previos han demostrado que el aumento del estrés mecánico que sufre una vena, secundario al aumento de la presión sanguínea, puede determinar cambios histológicos y moleculares en las diferentes células y tejidos que constituyen su pared. En los pacientes con IVC se han publicado numerosos estudios acerca de las lesiones que sufren las células endoteliales y las células musculares lisas de la pared venosa, así como alteraciones moleculares o cambios cuantitativos en la matriz extracelular, sobre todo en relación con las fibras de colágeno, las fibras elásticas y la actividad de metaloproteinasas;²⁴⁰⁻²⁴² pero los datos publicados son controvertidos y en muchos casos aún no son completamente concluyentes.

El estudio histológico de las venas safenas extirpadas en pacientes con enfermedad varicosa demuestra que los cambios no están distribuidos uniformemente a lo largo de la vena; antes bien, las áreas de engrosamiento intimal están habitualmente intercaladas con segmentos con dilatación de la pared venosa. En las zonas macroscópicamente tortuosas y engrosadas, estudio histológicos previos han demostrado engrosamiento de la íntima⁵⁷ y fibrosis de la capa media,^{131,250} asociándose hipertrofia,²⁴¹ o más frecuentemente atrofia de las células musculares lisas, junto con la presencia de fibrosis^{36,69,250} y fragmentación y degeneración de las fibras elásticas.^{69,107}

En la pared de las venas varicosas, algunos autores han descrito aumento irregular de fibras de colágeno, con respecto al escaso colágeno presente en las venas normales.⁶⁹ En contraste, otros autores han encontrado reducción en el contenido del tejido elástico en los segmentos de venas varicosas, sin acompañarse de cambios en el contenido de colágeno.¹²⁶ Pero en otros trabajos se ha descrito una desregulación de la síntesis de colágeno en las venas varicosas.^{88,208,210} De hecho, las células musculares lisas obtenidas de venas varicosas sintetizan más colágeno I, menos colágeno III y cantidades similares de colágeno V,^{208,210} lo

cual puede tener consecuencias sobre las propiedades mecánicas del tejido conjuntivo de las venas varicosas.²¹¹

En definitiva, las lesiones de varices en la extremidad inferior están directamente relacionadas con una debilidad de la pared venosa consecuencias de cambios histológicos y moleculares de la íntima y de la capa media vascular,¹⁷⁴ pero aún persisten en la literatura controversias acerca de la cuantificación de las lesiones histopatológicas y los mecanismos íntimos moleculares que determinan la aparición de varices. Por último es bien conocido que la dimensión fractal permite capturar la complejidad vascular;¹⁹⁹ sin embargo, en la revisión de la literatura no hemos encontrado ningún estudio que se haya centrado en la aplicación del análisis fractal y/o multifractal en venas de pacientes con IVC.

La realización del presente estudio exige la participación de un equipo multidisciplinar constituido por cirujanos vasculares, patólogos y biólogos moleculares, así como la asesoría de investigadores conocedores de métodos físico-químicos y biomatemáticos. Por ello, esta Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias a la coordinación del grupo de investigación constituido por el doctorando Luis Reparaz, experto médico especialista en Angiología y Cirugía Vascular y por los dos directores (Gabriel España, Cirujano Vascular y Javier Regadera, Patólogo) que se han responsabilizado, respectivamente, de los aspectos clínico-quirúrgicos e histopatológicos de este estudio, el cual está centrado en la evaluación de los mecanismos involucrados en las lesiones intimaes iniciales de venas safenas, obtenidas en pacientes con IVC en estadio C-2 y C-3. Previamente, los tres investigadores han trabajado conjuntamente en temas de patología vascular, desde hace treinta años (aunque intermitentemente), dado que coincidieron como Médicos Residentes en el Hospital La Paz de Madrid, además Javier Regadera dirigió la Tesis Doctoral de Gabriel España y ambos son coautores de varias publicaciones.^{71,72} Por último, en el equipo multidisciplinar de investigación han participado Juan Pedro Velasco Martín (biólogo) quien asesoró en los estudios morfométricos y Luis Condezo-Hoyos (Doctor en Química e Ingeniero químico), experto en modelos matemáticos aplicados a estructuras biológicas, incluida la evaluación de estructuras fractales, el cual recientemente ha compartido autoría en publicaciones internacionales con Gabriel España.⁵⁴

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

PRIMERA. ¿Las lesiones iniciales de engrosamiento intimal de la vena safena en los segmentos varicosos de pacientes con IVC presentan, a medida que avanza el engrosamiento intimal, un patrón histológico, inmunohistoquímico y morfométrico característicos?

OBJETIVOS

PRIMERO. Describir los diferentes grados de las lesiones histológicas de la íntima de la vena safena en pacientes con IVC, desde la lesión inicial hasta las lesiones de engrosamiento intimal bien establecido.

SEGUNDO. Evaluar los patrones de inmunoespresión de alfa actina muscular (*smooth muscle actin*, SMA) en relación con la proliferación de las células musculares lisas y el depósito de colágeno IV en la matriz extracelular intimal; y, asimismo, cuantificar la superficie de SMA y de colágeno IV en relación con el área total intimal, en cada uno de los grados del engrosamiento intimal.

TERCERO. Determinar la distribución de las fibras elásticas, así como su cuantificación histométrica, en los segmentos varicosos y su proporción respecto a la matriz extracelular de la íntima, en relación con el progresivo engrosamiento intimal. Además, demostrar los patrones de organización tridimensional de las fibras elásticas mediante el cálculo del número y de la dimensión fractal, visualizadas tanto en muestras histoquímicas de orceína para fibras elásticas, como a través de la cualidad de autofluorescente que tienen las fibras elásticas.

CUARTO. Establecer las posibles correlaciones entre los estudios cuantitativos histométricos de las fibras elásticas con los valores de la dimensión fractal, respecto a los diferentes grados de engrosamiento intimal y al ratio de fibras elásticas en relación con el área total intimal observado en los segmentos de vena safena con lesiones varicosas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En este estudio se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica de varias nuevas moléculas relacionadas con la patología varicosa en venas humanas, utilizando tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de 20 pacientes sometidos a safenectomía convencional, con extracción de vena safena mayor. En cada vena safena extirpada se consideraron dos regiones anatómicas: el segmento proximal inguinal y el segmento distal, a nivel maleolar.

MÉTODOS

Métodos de Estudio Histológico General

Fijación de las Piezas

Las piezas de flebectomía, que incluían toda la longitud de la vena safena, se fijaron inmediatamente por inmersión en formol neutro taponado al 4%, durante 72 horas.

Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas

Las piezas de safenectomía fueron seccionadas en cortes perpendiculares a todo lo largo del eje longitudinal de la vena safena, con una longitud de cada sección macroscópica de alrededor de 10 mm. A continuación, de cada segmento se obtuvieron tres nuevas secciones transversales, de aproximadamente 2 mm de espesor, y estos tejidos se procesaron para estudio histológico, usando un procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo®, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones fijadas, mediante pases consecutivos en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de butilo, dando dos pases de una hora cada uno. Finalmente las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60 °C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor de cada muestra de pared venosa, mediante un micrótopo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®, y las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con las siguiente

técnicas histológicas: Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrómico de Masson y Orceína para detección de fibras elásticas, siguiendo los métodos histológicos habituales. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

Método Inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)

Para estudiar la expresión de todas las moléculas evaluadas en las venas safenas, se ha utilizado el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) para la detección de los diferentes epítopes estudiados. Se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor de las secciones de pared venosa incluidas en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) o con xilano (Sigma, St Louis) durante 24 horas, con el fin de adherir mejor el corte histológico al portaobjetos. En la Tabla 2 se incluyen los anticuerpos utilizados, nombre de la casa comercial suministradora y dilución de trabajo en nuestro laboratorio.

Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Compañía	Dilución
SMA (monoclonal mouse anti-alfa actina muscular)	DAKO	1:400
Colágeno IV (monoclonal mouse anti-human Colagen IV)	ABCAM	1:400
Colágeno I (monoclonal mouse anti-human Colagen I)	ABCAM	1:400
Colágeno III (monoclonal mouse anti-human Colagen III)	ABCAM	1:400

Para realizar el método inmunohistoquímico de SBP en la detección de la expresión de estos 4 anticuerpos se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor del material incluido en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) o con xilano (Sigma, St Louis) durante 24 horas, con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos.

Las secciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, descrito por Hsu, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,^{153,197} las cuales se especifican a continuación: se realizó la desparafinización completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente pH 7,4, durante 5 minutos. Se precedió al desenmascaramientos del epítome mediante tratamiento por calor; para ellos, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con microondas en dos pases de 2,5 minutos, procurando que las preparaciones no llegasen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizó un lavado rápido, dos minutos, en H₂O destilada para retirar el sobrenadante del buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente, realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. A continuación, añadimos el anticuerpo primario específico, diluido a la concentración especificada en la Tabla 2, en una solución de PBS+BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4 °C cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añadió a las secciones el complejo biotinilado anti-ratón, con una dilución 1:200, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y a temperatura ambiente. Se incubaron las preparaciones en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Zymet, San Francisco, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunoreacción se reveló con diaminobencidina (Sigma, St. Louis, USA) (30 mg de diaminobencidina en 10 ml de buffer tris-HCl, a pH 7,4 y con H₂O₂ al 0,015%). El tiempo de revelado con diaminobencidina es de 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se

lavarón con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

Métodos de Fluorescencia de fibras elásticas

La organización de las láminas elásticas fue evaluada en cortes seriados de 5 μm de espesor de venas fijadas en formol e incluidas en parafina. Se ha usado un microscopio de fluorescencia Leica DMLB, con una fuente de luz fluorescente ebq 100. Los segmentos venosos intactos fueron visualizados con una longitud de onda de 488/515 nm, y las imágenes de la pared venosa fueron capturadas con el objetivo de 40 aumentos en el punto central de la vena. Las imágenes se tomaron con una cámara digital Leica DC 200, prolongando el tiempo de exposición. Las imágenes de la lámina elástica interna y de las fibras elásticas de la íntima varicosa engrosada se fotografiaron en varios planos de corte con el fin de clarificar la organización tridimensional de la lámina elástica interna, y para precisar los cambios de elastogénesis y de elastolisis asociados a la fibrosis intimal presente en las venas varicosas.

Métodos de Cuantificación

El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar después las cuantificaciones histométricas, se describe brevemente a continuación: Las áreas seleccionadas para las cuantificaciones fueron aquellas que, habiendo sido valoradas por tres patólogos, se consideraron adecuadas, rechazándose aquellos campos microscópicos con artefactos de corte. Posteriormente, la selección de campos dentro de las áreas se llevó a cabo aleatoriamente; el límite más exterior de las áreas se dibujó sobre la laminilla y ésta se desplazó sin sobrepasar los límites marcados y sin realizar valoraciones subjetivas de visualización directa de los campos microscópicos elegidos.

Se escogieron 10 campos en cada área previamente delimitada, ya que usualmente este es el número que se selecciona para una visualización de distribución espacial homogénea de tejidos histológicos. Se verificaron dos métodos de selección de campos microscópicos para una superficie dada: en el primero, denominado de "*selección subjetiva*", uno de los más usados hasta este momento, un observador selecciona diez campos

asegurándose de que estén distribuidos homogéneamente sobre la superficie seleccionada. Este método, rápido y sencillo, pudiera fácilmente determinar algún sesgo. Con el fin de valorar las posibilidades de sesgo generadas por el muestreo objetivo, se procedió a realizar un segundo método de selección de campos, denominado de "*selección aleatoria*", el cual es un método de selección no sesgado. Para este propósito, se utilizó un retículo para dividir la superficie del campo en 100 partes iguales. A cada campo se le asignó una combinación de dos dígitos, y a través del uso de una tabla de números al azar se escogieron 10 combinaciones. Este método es más laborioso pero garantiza la ausencia de sesgo. Los dos métodos se utilizaron para seleccionar los campos en cada sección. En cada campo microscópico, tomado con un objetivo de 40 aumentos, se realizaron las diferentes determinaciones morfométricas de cada una de las estructuras de la túnica íntima de las venas, utilizando preparaciones inmunomarcadas con anticuerpos anti-SMA y anti-colágeno IV y otras preparaciones teñidas con orceína, o vistas con el microscopio de fluorescencia para demostrar la distribución de las fibras elásticas.

Todas las muestras histológicas fueron fotografiadas con un fotomicroscopio Leica Eclipse 55i equipado con una cámara digital Leica DC200 y adquiridas con el software Image-Pro Plus y procesadas en formato TIFF. Todas las fotografías fueron realizadas con el objetivo de 40x. En cada muestra se fotografió la túnica íntima y la túnica media. Estas imágenes se procesaron con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). ImageJ es un excelente programa de análisis de imágenes que es utilizado para la cuantificación de una gran variedad de estructuras histológicas. En el presente estudio se cuantificaron pormenorizadamente la expresión de los diferentes marcadores en la túnica íntima.

Es necesario aclarar que el programa de procesamiento de imagen digital Image J es software de dominio público, programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health. La primera versión del programa fue desarrollada por Wayne Rastban en 1997. Las características actuales del programa consisten en numerosas plugins y macros (macroinstrucciones) para el procesamiento de imágenes y operaciones de análisis, incluyendo segmentación y extracción de la imagen, reducción del ruido, transformaciones de la imagen y análisis de partículas. Estas características han sido completamente

expandidas por una amplia base de usuarios activos. Actualmente existen cientos de plugins y macros disponibles para su descarga. Otras ventajas del programa incluyen la capacidad de soportar numerosos tipos de formatos independientes de la plataforma. Como resultado de su independencia del tipo de plataforma, ImageJ es capaz de funcionar en múltiples sistemas operativos, incluyendo MS Windows, Apple OS y Linux.

Para una mejor optimización del análisis morfométrico del área ocupada por las células musculares lisas alfa actina muscular + (SMA) y del área ocupada por las fibras de colágeno IV y de fibras elásticas Orceína + en las áreas de engrosamiento intimal y en las áreas de pared venosa sin lesiones (grupo control con íntima normal), en relación con el área total de la íntima venosa (respectivamente con lesiones varicosas iniciales y sin lesiones) se procedió al denominado "*colour deconvolution*", esto es al "*plugin colour*", desarrollado por Gabriel Landini (Landini G: [Colour deconvolution plugin 1.5.\[http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html\]](http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html)), lo cual permitió separar imágenes originales en tres imágenes con color monocromo que contienen los componentes del método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) usando el vector H-DAB. El plugin crea una imagen adicional correspondiente al revelado con DAB de color marrón. Debido a que las regiones de interés son aquellas que expresan una tinción de color marrón, solo la imagen de 8-bit DAB fue conservada.

A continuación se realizó la segmentación de la imagen a cuantificar, mediante el uso de la herramienta "*threshold*" (umbral), con el fin de separar los píxeles más oscuros que el valor de umbral. Mediante esta selección se pudo conseguir una valoración perfecta de las regiones que presentaron tinción histológica específica, y distinguirlas de aquellas con tinción negativa para la estructura motivo de cuantificación. En cada imagen, después de aplicar el "*plugin colour deconvolution*" y seleccionar el valor umbral, se procedió a cuantificar el área correspondiente a la superficie total de la íntima y el áreas de cada marcaje específico, bien de la expresión inmunohistoquímica de SMA en las fibras musculares lisas, así como del marcaje de Colágeno IV, o bien de la tinción histoquímica de Orceína para las fibras elásticas, en la las áreas de lesión intimal inicial de desarrollo de

varices. El resultado se expreso como la proporción entre el área específicamente marcada y el área total de la túnica íntima.

Métodos de Estudio de Fractales

El subprograma Fraclac incluido en el programa de análisis de imagen Image J de libre distribución (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) se empleó para calcular la dimensión fractal y lacunaridad; así como, para llevar a cabo el análisis multifractal de las imágenes de tinción con orceína. Fraclac detecta solamente pixeles negros sobre un fondo blanco, por lo que las imágenes originales a analizar se convirtieron en binario, utilizando la opción *process/Binary/Make binary* de Image J.

La **Dimensión Fractal** (DC) se midió mediante superposición de la imagen binaria de la túnica íntima de las venas teñidas con orceína con una malla de cajas y contadores del número de cajas. DB es la pendiente de la línea de regresión del gráfico log-log del tamaño de las cajas (escala) y número de cajas contadas; es decir:

$$N(\varepsilon) \approx \varepsilon^{DC}$$

La opción de dimensión fractal local de Fraclac con un número de pixeles de las cajas en el eje X e Y igual a 10 se empleó para el cambio de DC a lo largo del tejido venoso.

El **Análisis Multifractal** toma en cuenta las variaciones de la intensidad en las venas mediante la medida de la densidad pixel en cada una de las cajas. El gráfico de $f(\alpha)$ versus $\alpha(q)$ conocido como espectro multifractal se empleó para comparar las fibras elástica en la íntima de las venas, como previamente fue descrito por Chhabra y Jensen, 1989.⁴⁷ Las dimensiones fractales generalizadas D_0 , D_1 y D_2 , correspondientes, respectivamente, a $q=0$, $q=1$ y $q=2$, se obtuvieron de manera directa del espectro multifractal, usando Fraclac de Image J, con el tamaño de muestra por defecto y mediante un procedimiento estándar. Simultáneamente, con el objeto de valorar la naturaleza multifractal de las imágenes analizadas, se obtuvo la gráfica DB (q) versus q. Es necesario constatar que, si las dimensiones fractales generalizadas no cambian con q, significa que se está frente a imágenes monofractales.

Métodos Estadísticos

En la estadística descriptiva, en general, para las variables de estudio de tipo cualitativo, empleamos como resumen la frecuencia absoluta (n) y la relativa en forma de porcentaje (%). Para las variables cuantitativas, en primer lugar se comprobó la “normalidad” de éstas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, las variables que se ajustan a la distribución normal se resumen mediante la media como la medida de tendencia central y la desviación típica como medida de dispersión. Cuando se realizaron estudios de Estadística Univariante, en todos los análisis se estableció un nivel de significación en valores por debajo de 0,05, lo que es lo mismo que decir que se establece un nivel de confianza del 95%. Para estudiar las diferencias de medias en la expresión de proteína, se empleó la prueba T de Student con corrección para varianzas no homogéneas, si fuera necesario, y Anova cuando comparamos más de dos grupos con test de Bonferroni, con el fin de estudiar a posteriori entre qué grupos existen esas diferencias. En el caso de que las variables a estudiar no siguieran una distribución Normal se realizó el test no paramétrico más apropiado (Mann-Whitney o Kruskal-Wallis).

Técnicas Fotográficas

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop CS4. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press Passport 6.0.

RESULTADOS

ALTERACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LA ÍNTIMA DE LA VENA SAFENA CON LESIONES VARICOSAS

En la presente Tesis centrada en el estudio morfológico de las fases iniciales del desarrollo de la fibrosis intimal en la pared de venas varicosas se demuestra la participación de una proliferación e hiperplasia de células musculares lisas, desde las fases más iniciales de la lesión (Figuras 1 y 2). El material de la lámina basal, que es colágeno IV positivo, rodea las fibras musculares intimaes (Figura 3)

En la vena safena normal, la íntima queda separada de la capa media por una lámina limitante elástica interna circunferencial continua, pero ya desde el inicio de la lesión se observa un fino depósito intimal de material elástico y fibras elásticas finas y cortas (Figuras 4-7). Asociado a este depósito de fibras elásticas incompletas, frecuentemente la lámina elástica limitante interna se dicotomiza; así mismo, también en múltiples áreas a lo largo de la pared venosa pierde su continuidad, siendo sustituida por tejido conjuntivo desordenado.

El estudio morfométrico de las fibras musculares lisas de la pared venosa se realiza mediante la evaluación de la expresión de Alfa Actina Muscular (SMA). Con este método inmunohistoquímico se demuestra cómo la superficie inmunopositiva en la capa íntima aumenta a medida que se produce el engrosamiento intimal. Sin embargo, cuando se calcula la proporción del área ocupada por las células musculares lisas SMA+, con respecto a la superficie total de la íntima, se observa una progresiva disminución del músculo liso ($p < 0,01$) en los grupos con mayor engrosamiento intimal (Tabla 3 y Figuras 8-10).

Los datos de la cuantificación de la superficie inmunomarcada con el anticuerpo anti-colágeno IV, recogidos en la Tabla 4 y figuras 11-13, permiten comprobar que existe una relación directa entre el grosor intimal y el incremento de material lámina basal colágeno IV positivo; sin embargo, cuando se compara la superficie de inmunomarcaje por unidad por la superficie total intimal (esto es, por la unidad de área intimal) se observa una rápida disminución ($p < 0,01$) de la proporción de colágeno IV desde el estadio inicial de la lesión (15 a 49,9 μm), con respecto al grupo de engrosamiento moderado intimal (50 a 99,9 μm); pero esta disminución se estabiliza en el grupo con engrosamiento intimal intenso (mayor 100 μm).

La morfometría de las fibras elásticas orceína positivas muestra cómo la superficie ocupada por las fibras elásticas va aumentando progresivamente y paralelamente al incremento de la superficie de la íntima. Sin embargo, a pesar del desarrollo de este proceso de elastogénesis intimal, la proporción que ocupan estas fibras elásticas en la íntima, respecto al área total intimal, sufre una progresiva y significativa disminución a medida que aumenta la hiperplasia intimal (Tabla 5 y Figuras 14-16).

Con el fin de valorar la disposición tridimensional de las fibras elásticas en los diferentes estadios de fibrosis intimal, se procedió al estudio de fractales, incluido el número fractal y la dimensión fractal de las fibras elásticas, identificadas mediante el método histoquímico de orceína y mediante la propiedad de autofluorescencia que tienen las fibras elásticas. Tanto el número fractal, como la dimensión fractal demostraron diferencias significativas entre los segmentos varicosos con respecto a los segmentos de vena safena sin lesión. El espectro multifractal en relación con la fibrosis intimal muestra cambios significativos en la ordenación espacial a medida que progresa la lesión, tanto cuando se determina en las preparaciones teñidas con orceína, como en las estudiadas mediante fluorescencia (Figuras 17-22).

Por último, hemos demostrado una correlación positiva y significativa entre la dimensión fractal de las fibras elásticas de la íntima con respecto a la altura intimal; asimismo, hemos encontrado una correlación significativa, pero negativa, entre la dimensión fractal de las fibras elásticas de la íntima orceína positiva, con respecto a la proporción relativa de la superficie de fibras elásticas respecto al área total intimal (Figuras 23 y 24).

Figura 1. Expresión de alfa-actina de músculo liso en las capas íntima y media de la vena safena normal

- a. Sección histológica de una vena safena normal en la que se aprecia que una íntima virtual delimitada internamente por un endotelio que se apoya sobre una lámina basal y una lámina elástica interna muy flexuosa y a veces discontinua. En la inmediata vecindad del endotelio se identifican pequeñas fibras musculares lisas longitudinales con expresión citoplasmática de alfa actina de músculo liso (SMA). En la túnica media se disponen múltiples fascículos circunferenciales de células musculares lisas de amplio citoplasma con intensa inmunexpresión de SMA y entre se deposita un tejido conjuntivo laxo con una abundante matriz extracelular.
- b. Se observa el inicio de engrosamiento intimal caracterizado por una mayor cantidad de células musculares lisas SMA+ con hipertrofia de citoplasma. La matriz extracelular de la íntima esta aumentada y rodea a estas fibras. En la media existen grandes fascículos de músculo liso SMA+ cortados oblicuamente y separados por una moderada cantidad de tejido conjuntivo.
- c. La íntima presenta un ligero engrosamiento en donde se identifican células musculares lisas hipertróficas SMA+ dispuestas longitudinalmente. Externamente se observa de matriz extracelular intimal, el cual se continúa con las capas circunferenciales de músculo liso de la media vascular.
- d. Moderado engrosamiento intimal en el que predomina la matriz extracelular, aunque se visualiza una fina capa de células musculares lisas SMA+ de disposición subendotelial.

Expresión de Alfa-Actina de Músculo Liso en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena Normal

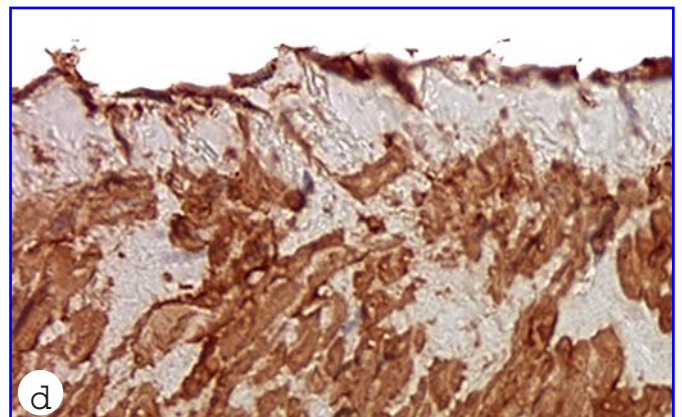
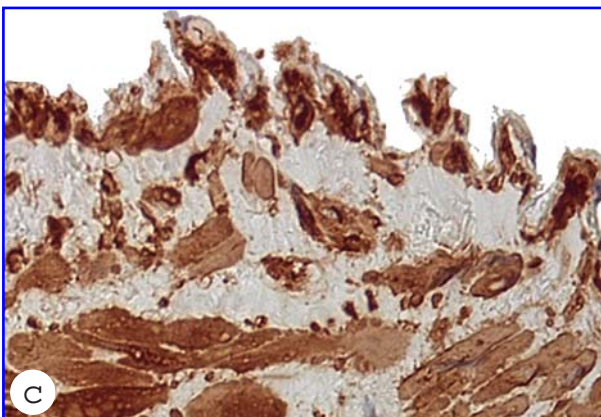
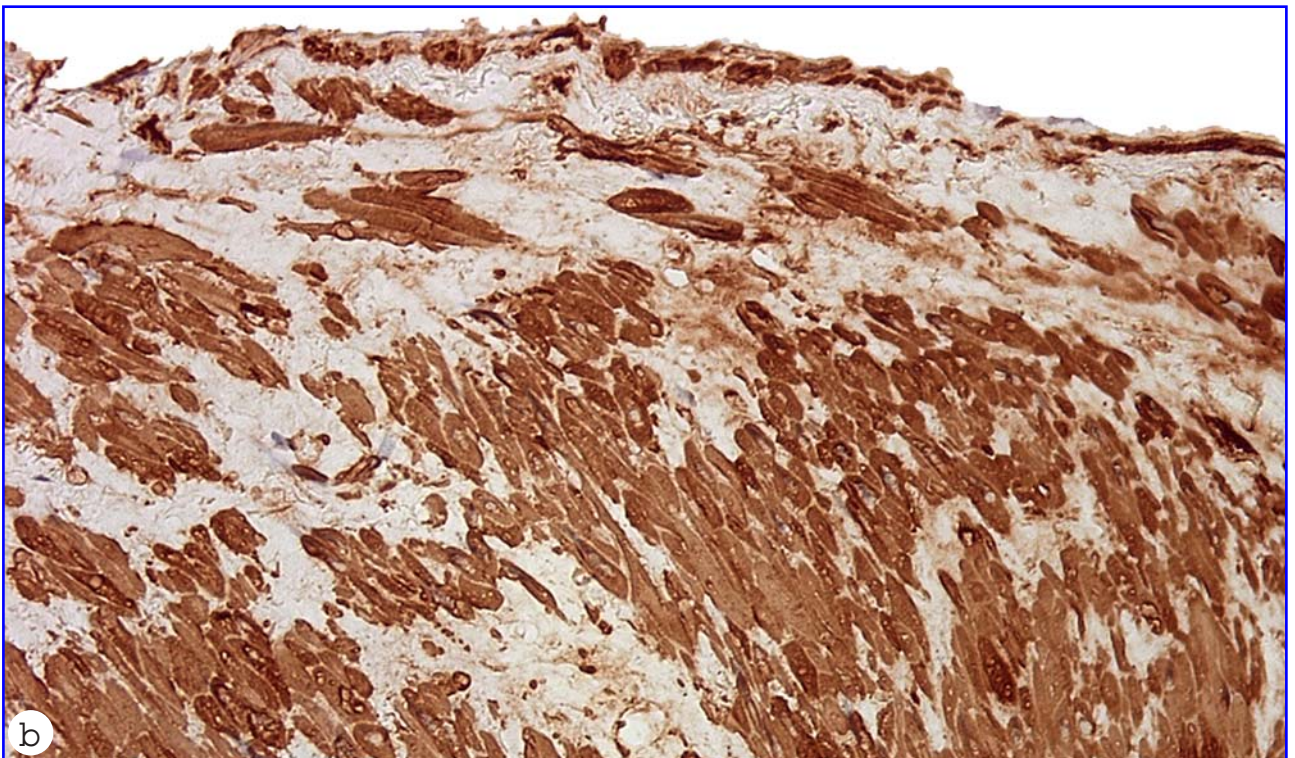
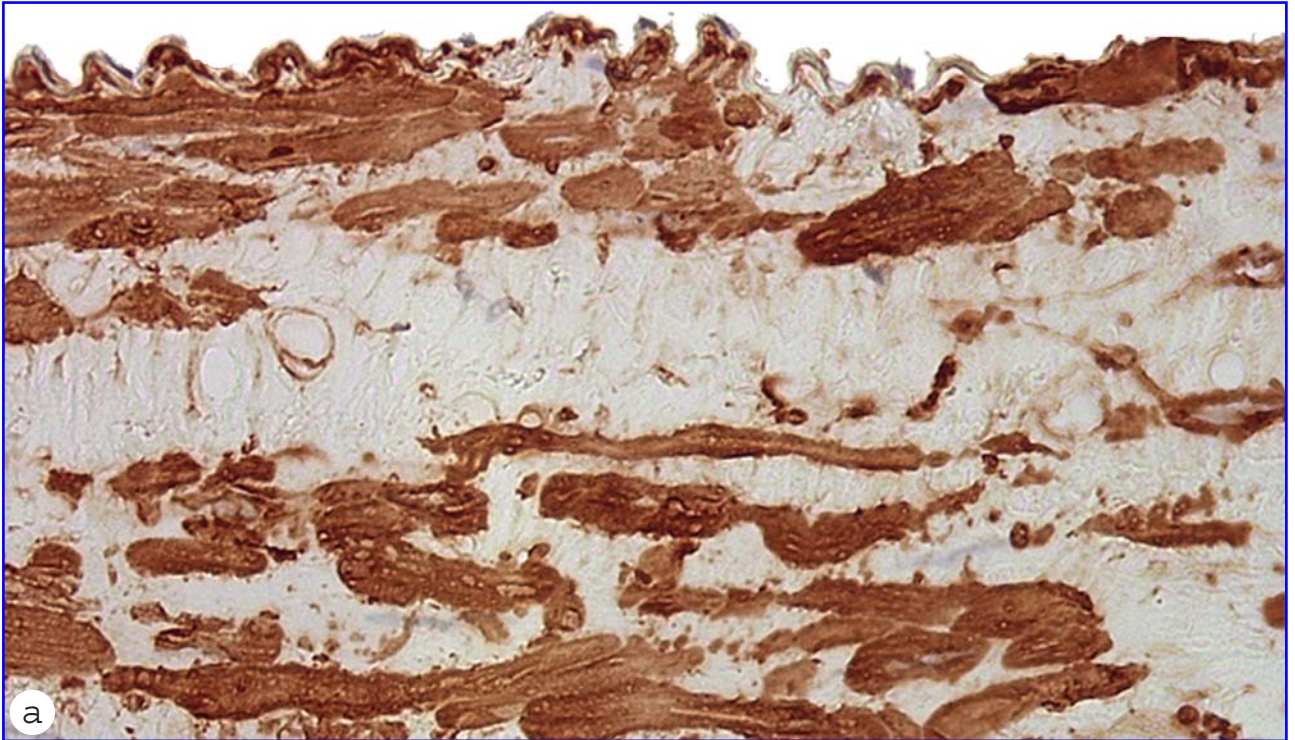


Figura 2. Expresión de alfa-actina de músculo liso en las capas íntima y media de la vena safena con lesiones varicosas

- a. Sección transversal de una vena safena de un paciente con insuficiencia venosa crónica inmunomarcada con SMA. Se observa todo un espectro de lesiones de engrosamiento intimal. Las capas musculares y el tejido conjuntivo de la túnica media son normales y la túnica adventicia no presenta lesiones.
- b. Corte seriado del caso anterior con un evidente engrosamiento intimal con muy abundantes células musculares lisas SMA+ dispuestas transversalmente. La túnica íntima de la túnica media se encuentra separada por una fina capa de tejido conjuntivo laxo. El abundante músculo liso de la capa media queda separado por finos tabiques de tejido conjuntivo laxo.
- c. Importante engrosamiento intimal con una distribución muy irregular de leiomiocitos SMA+, cortados transversalmente, rodeados por abundante matriz extracelular.
- d. En la túnica íntima engrosada, las células musculares lisas presentan diferente intensidad de expresión de SMA, observándose células hipertróficas, junto con otras atróficas. Se aprecian zonas de la íntima constituidas exclusivamente por matriz extracelular.

Expresión de Alfa-Actina de Músculo Liso en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena con Lesiones Varicosas

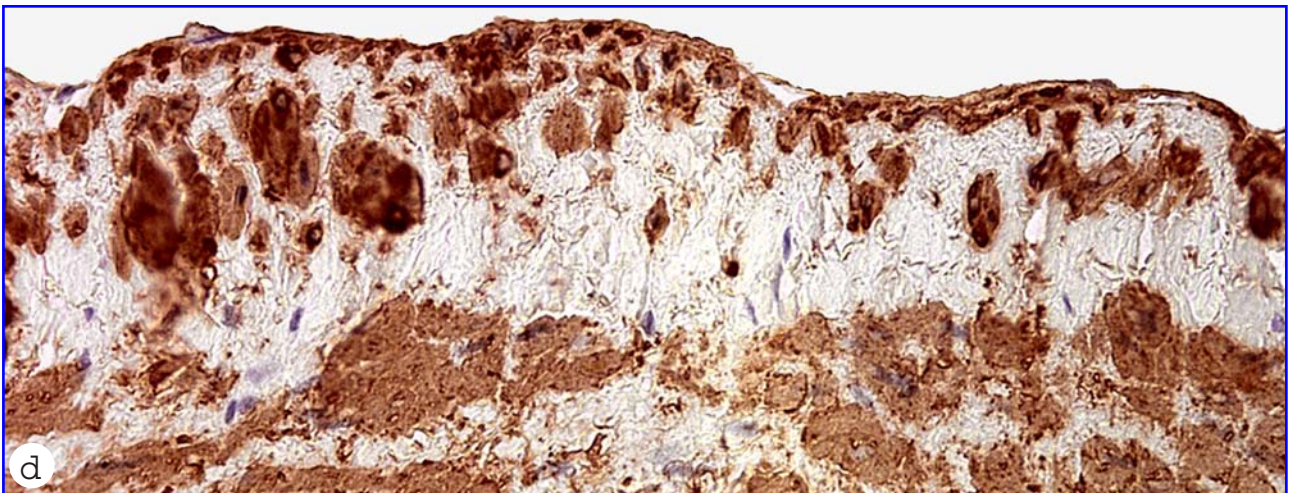
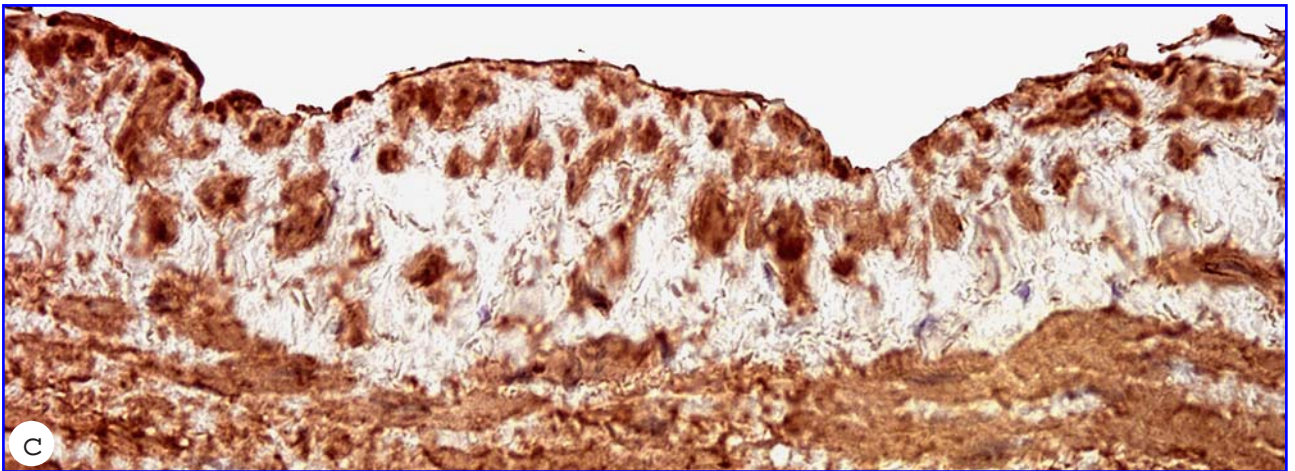
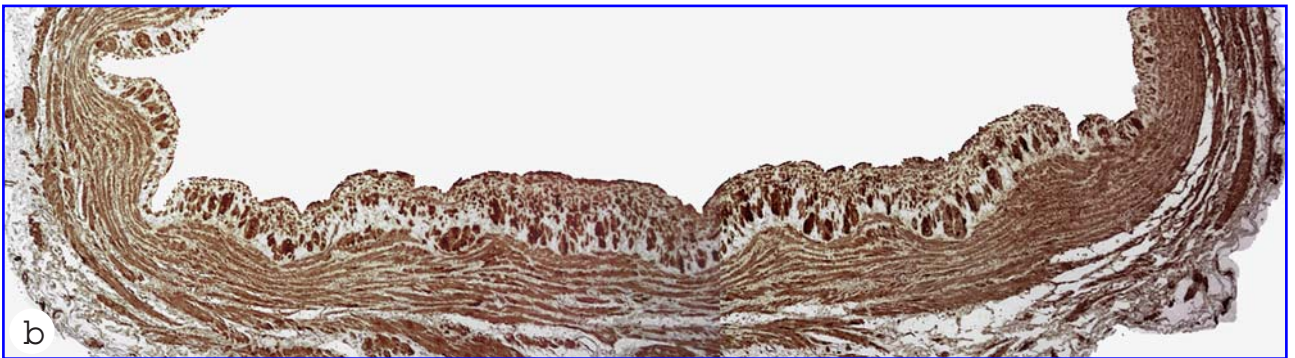
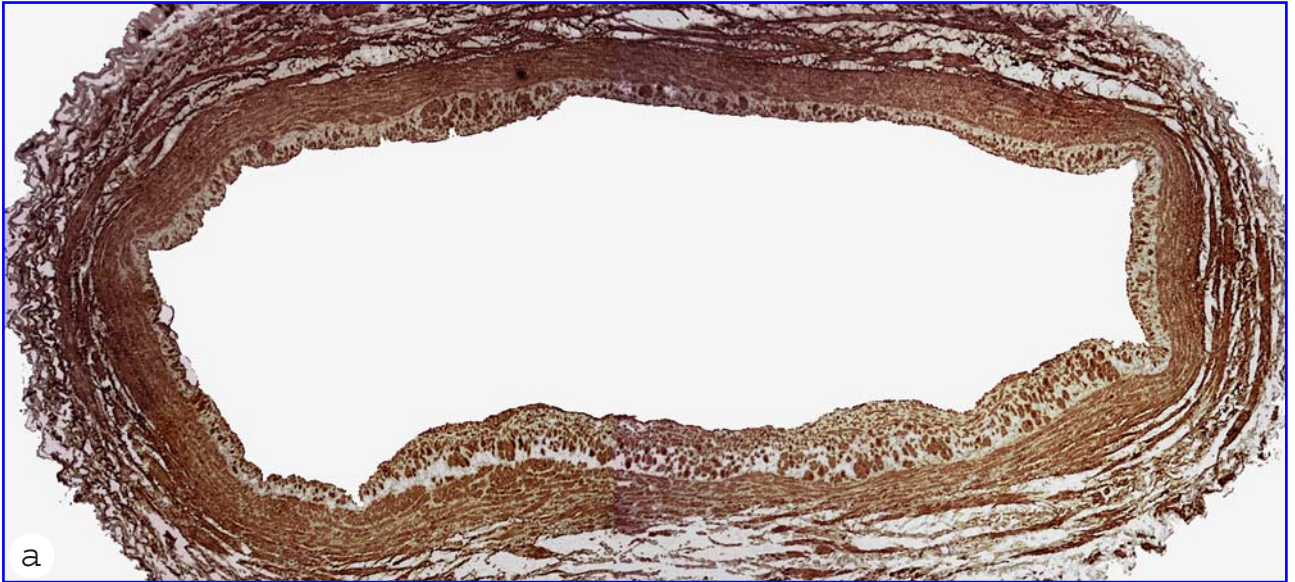


Figura 3. Expresión de colágeno IV en las capas íntima y media de la vena safena con lesiones varicosas

- a.** Sección transversal de una vena safena normal inmunomarcada con un anticuerpo anti-colágeno IV. La túnica íntima está ligeramente engrosada por el depósito de matriz extracelular y contiene un fino retículo de inmunomarcaje. En la capa media también se observa depósito de colágeno IV rodeando las células musculares lisas.
- b.** Lesión varicosa con moderado engrosamiento intimal. Se distinguen muy bien el revestimiento endotelial, apoyado sobre la lámina basal inmunomarcada con colágeno IV. Externamente se evidencia un extenso depósito de matriz extracelular que contiene una mínima expresión de colágeno IV. Externamente la capa media es normal y en el intersticio se observa un evidente depósito de colágeno IV en la vecindad de las fibras musculares lisas.
- c.** Vena safena con una capa media normal y un intenso engrosamiento intimal. En la íntima se aprecia un inmunomarcaje de colágeno IV subendotelial y unas finas y escasas fibrillas de colágeno IV dispuestas en la matriz extracelular.
- d.** Detalle de la porción superficial de otra sección del caso anterior en el que se evidencia un claro depósito de colágeno IV subendotelial y una más irregular y escasa distribución entre la matriz extracelular amorfa.

Expresión de Colágeno IV en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena con Lesiones Varicosas

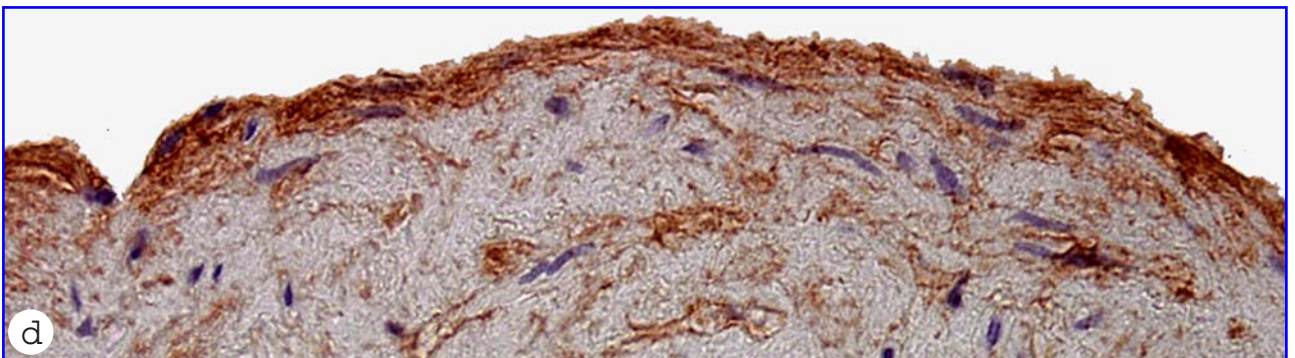
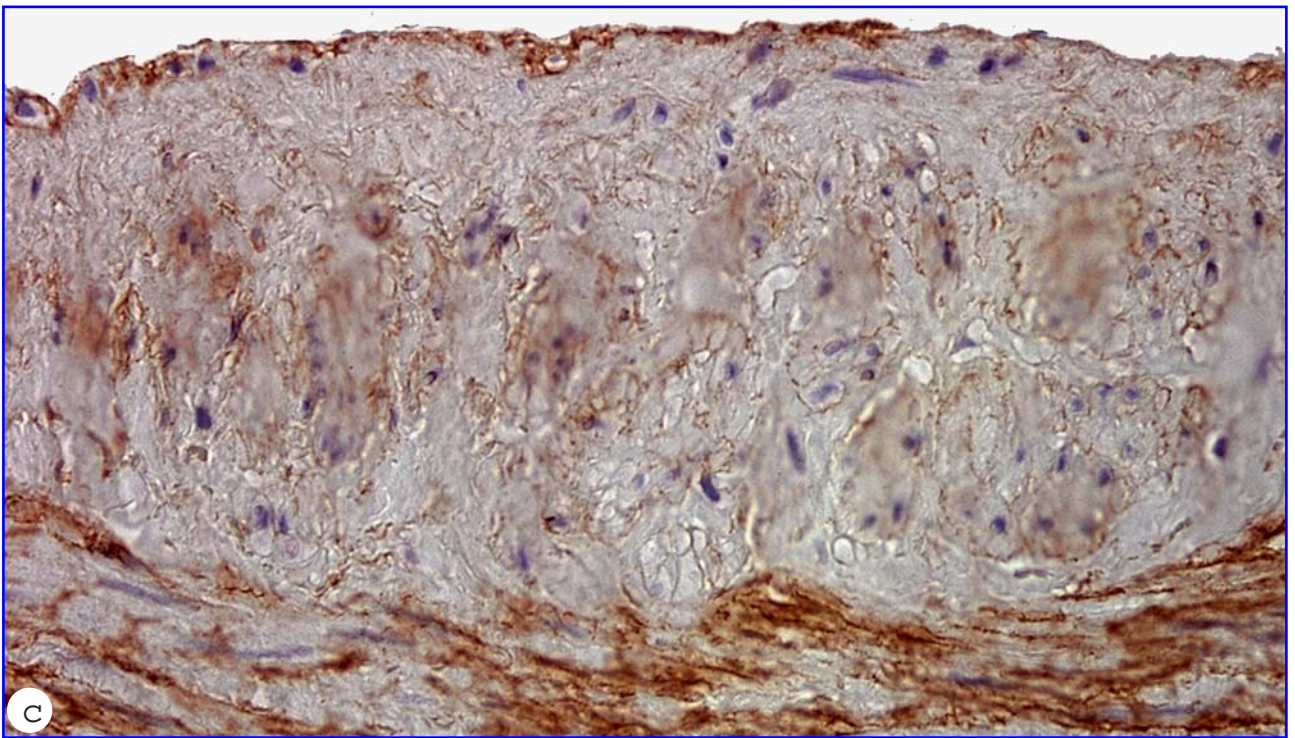
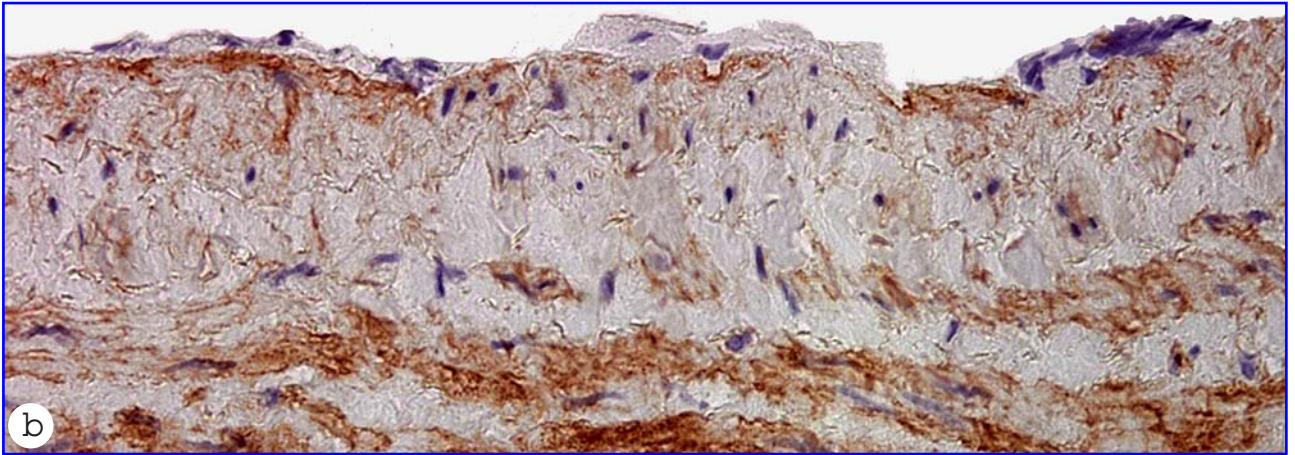
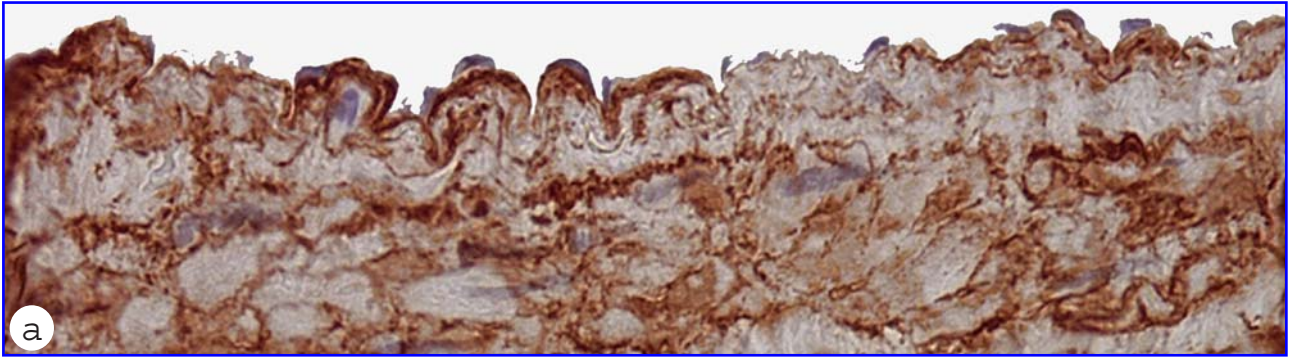


Figura 4. Distribución de las fibras elásticas en las capas íntima y media de la vena safena con lesiones varicosas

- a. Vena safena normal en la que se demuestra una lámina limitante elástica interna continua muy flexuosa teñida por el método de orceína y un mínimo tejido conjuntivo subendotelial. Debajo de la íntima se distribuyen segmentos de láminas elásticas circunferenciales paralelos y entre ellos abundante tejido conjuntivo.
- b. En la fase inicial de la enfermedad varicosa se produce un discreto engrosamiento intimal. En la imagen se observan segmentos de una íntima normal que alternan con otros mínimamente engrosados en los que se observan fibras elástica orceína positivas. La capa media contiene fibras elásticas cortas, algunas de disposición circunferencial, con abundante tejido conjuntivo asociado a células musculares lisas.
- c. En otra sección venosa del caso anterior se evidencia en el centro de la imagen una íntima normal con un endotelio apoyado virtualmente sobre una lámina elástica interna y a ambos lados sendas lesiones iniciales de engrosamiento intimal con un predominio de material elástico orceína +. La estructura de la capa media es semejante a la de la imagen anterior.
- d. Lesión ligera (engrosamiento intimal menor de 50 μm) constituida por un depósito de múltiples copias elásticas cortas y muy finas, en comparación con la lámina elástica interna robustamente teñida con orceína +. Más externamente, la túnica media presenta gran cantidad de tejido conjuntivo con depósito de láminas elásticas circunferenciales incompletas.
- e. Enfermedad varicosa inicial con una limitante elástica interna dicotomizada, formando láminas circunferenciales concéntricas en el interior de la íntima, existiendo además células musculares lisas intimaes cortadas transversalmente. Por fuera se disponen las fibras musculares lisas circunferenciales de la capa media entre las cuales se evidencian fibras elásticas de muy escasa longitud.

Distribución de las Fibras Elásticas en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena con Lesiones Varicosas

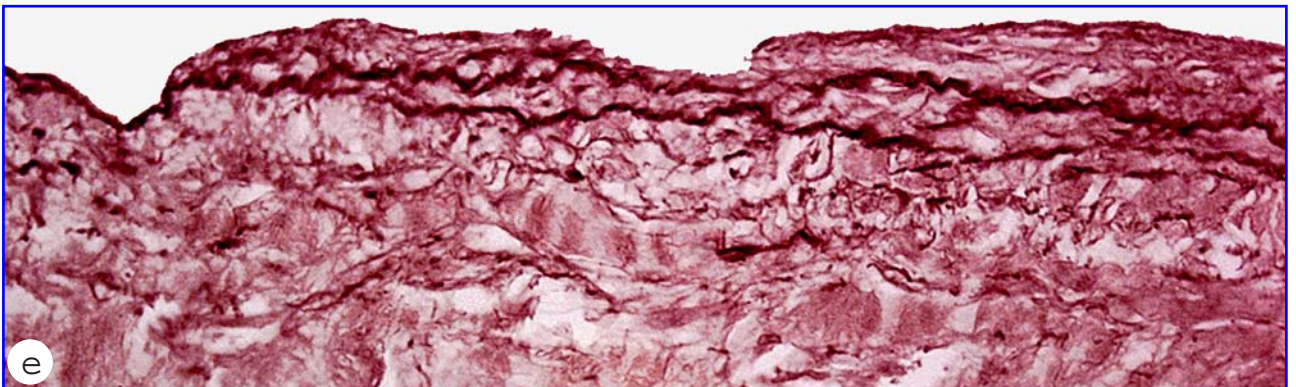
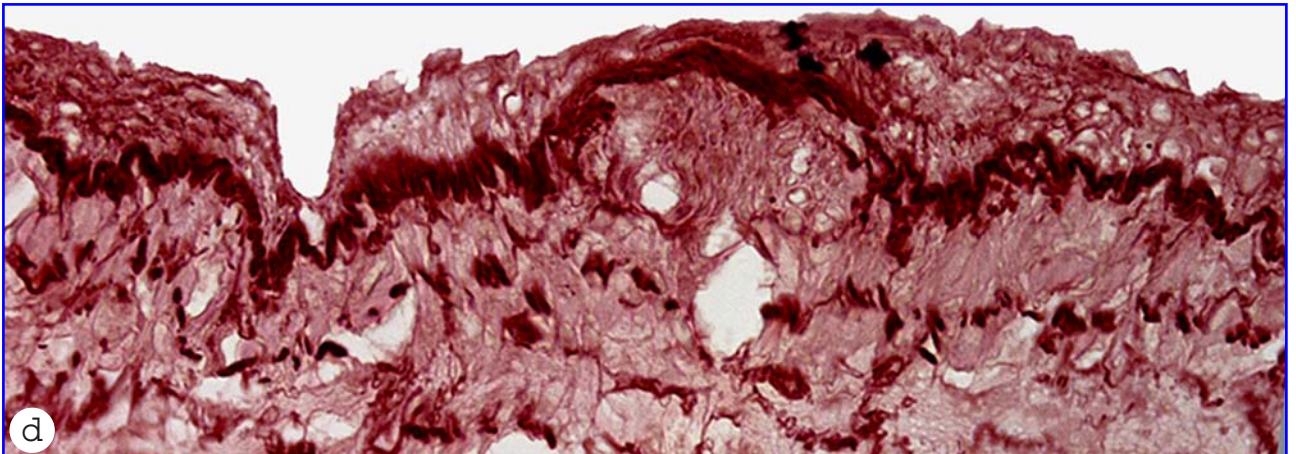
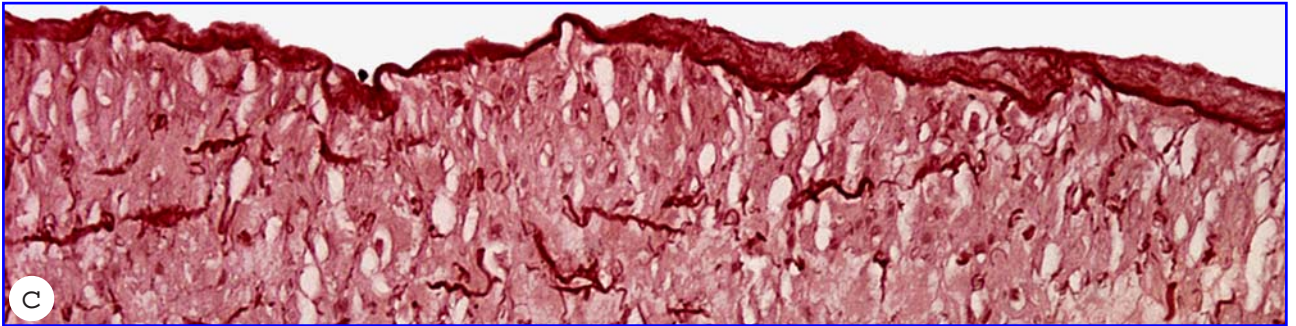
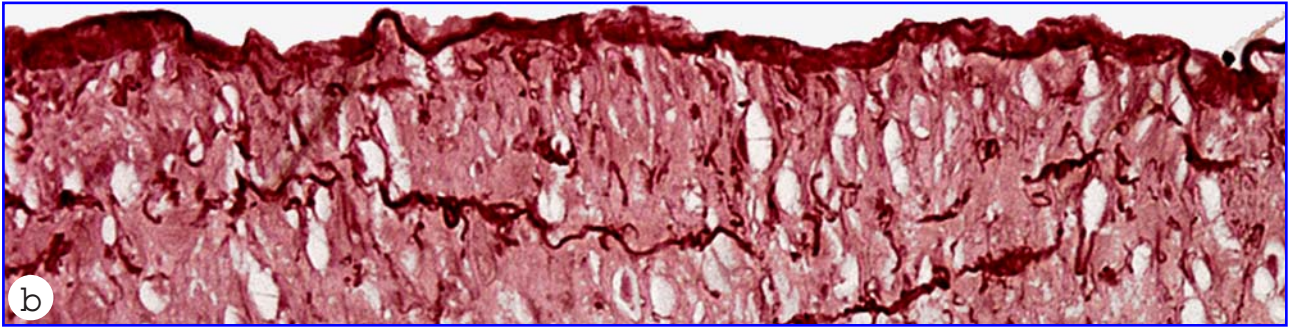
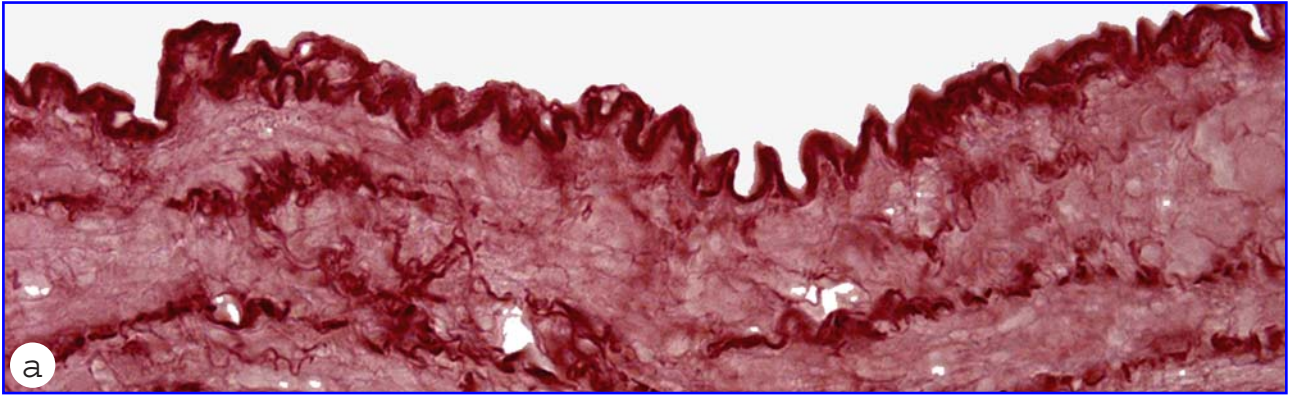


Figura 5. Distribución de las fibras elásticas en las capas íntima y media de la vena safena con lesiones varicosas

- a.** Engrosamiento intimal moderado con gran depósito de material elástico intensamente teñido con el método orceína. Se distingue una limitante elástica interna gruesa que separa la íntima de la media. El número y tamaño de las fibras elásticas de la capa media es notoriamente menor.
- b.** Existe una evidente formación de láminas elásticas espiralizadas, asociadas a depósito de fino material elástico amorfo, en la zona de engrosamiento intimal. La lámina elástica limitante interna es discontinua y en múltiples segmentos la limitante intimal carece de lámina elástica. La zona superficial de la media contiene escasas y cortas fibras elásticas.
- c.** Lesión varicosa con engrosamiento intimal moderado en el que se observa una limitante elástica interna muy irregular y focalmente discontinua, por el encima de la cual se distinguen varias láminas elásticas paralelas, que muestran un corto trayecto espiralizado. La parte más luminal de la íntima muestra depósito de matriz extracelular. En la capa media la presencia de fibras elásticas es escasa.
- d.** La parte izquierda de la imagen muestra un segmento de pared venosa normal, sin engrosamiento intimal y con una lámina elástica interna gruesa y continua. Bruscamente, en la porción diestra de la imagen se aprecia un progresivo engrosamiento intimal caracterizado por una gruesa lámina elástica interna orceína positiva que se dicotomiza. Por encima se ven varias láminas elásticas irregulares y depósito de tejido conjuntivo rico en matriz extracelular.

Distribución de las Fibras Elásticas en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena con Lesiones Varicosas

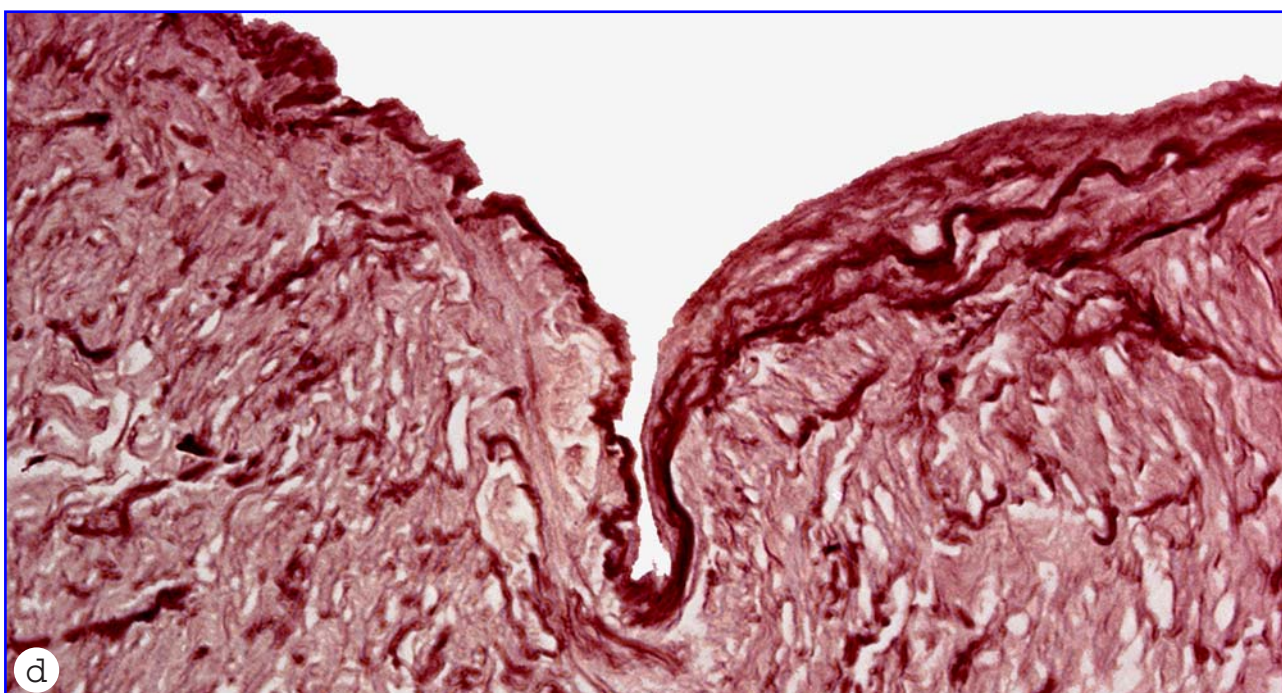
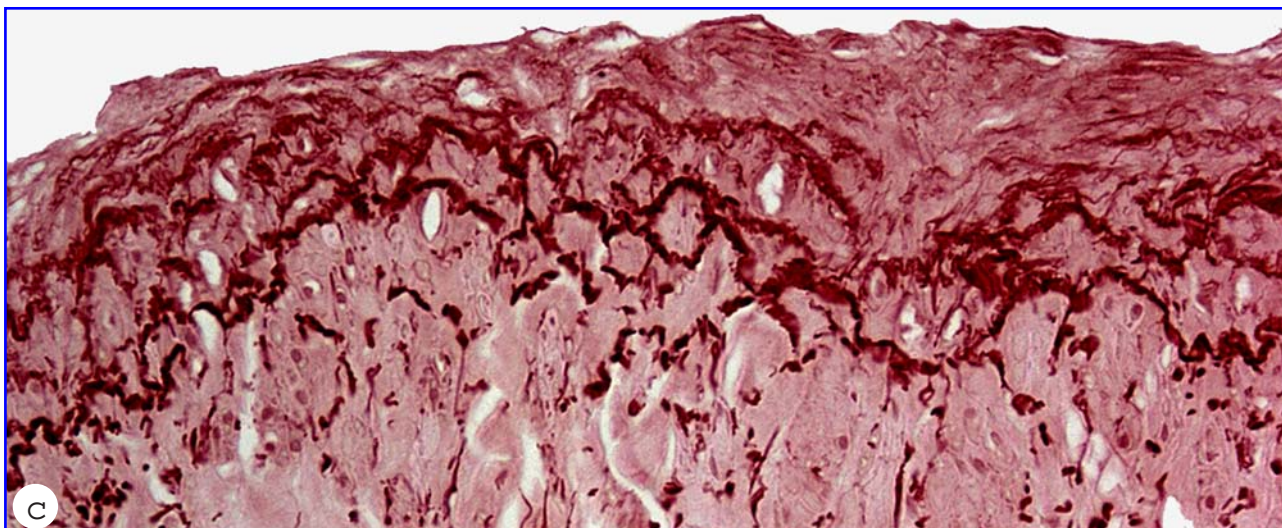
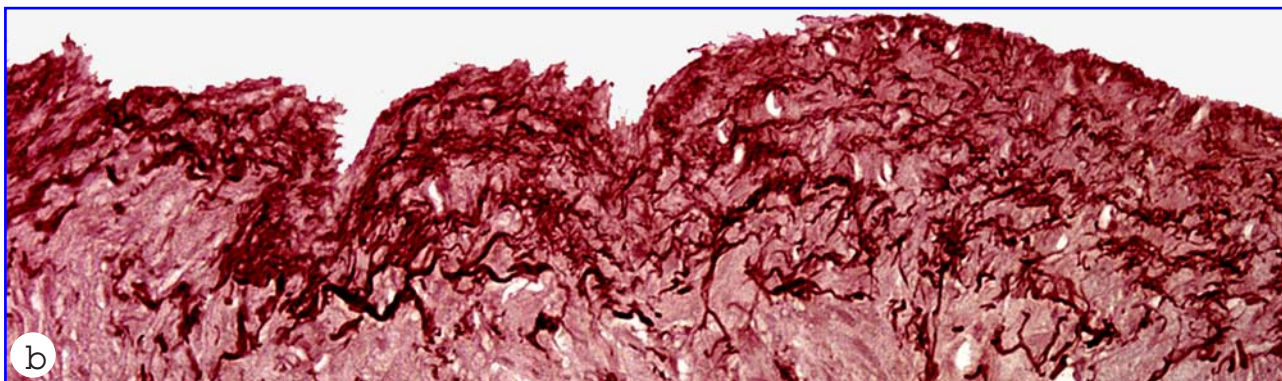
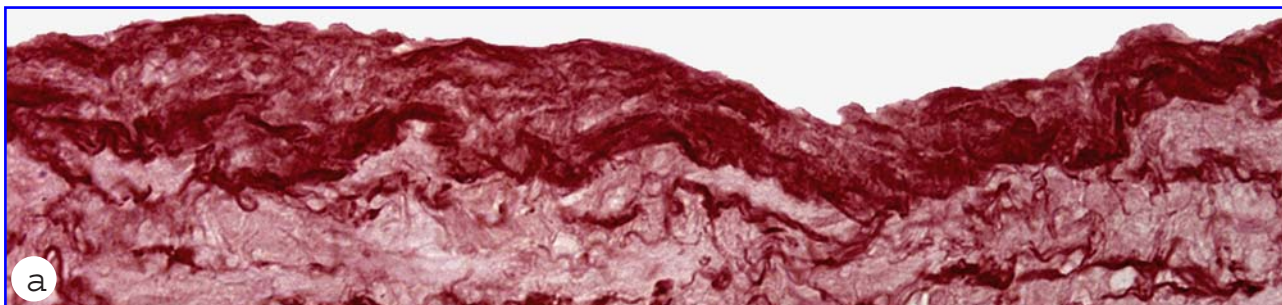


Figura 6. Distribución de las fibras elásticas en las capas íntima y media de la vena safena con lesiones varicosas

- a.** Transición de un engrosamiento moderado a uno intenso de la íntima de una vena varicosa. La lámina limitante elástica interna en algunas zonas es discontinua y en otras es muy gruesa. En la íntima la elastogénesis está poco desarrollada y solo se ve fino material elástico entremezclado con abundante matriz del tejido conjuntivo.
- b.** Engrosamiento intenso intimal caracterizado por una mayor elastogénesis que en el caso anterior y por una elástica interna engrosada y duplicada en algunas zonas.
- c.** El gran engrosamiento intimal se debe principalmente al depósito de fibras elásticas incompletas y material elástico que rodea una variable matriz extracelular.
- d.** Debajo de una íntima muy engrosada con elastogénesis incompleta, se observa una lámina elástica interna que se dicotomiza englobando al tejido conjuntivo muscular de la capa media.
- e.** Intenso engrosamiento focal de la íntima que protruye en la superficie luminal de la vena. En la íntima se detecta una zona superior con mayor depósito de fibras elásticas arremolinadas y zona inferior con menor elastogénesis. Nótese el importante engrosamiento y la robusta tinción de la lámina elástica interna.
- f.** Toda la íntima, muy engrosada, está ocupada por fibras elásticas tortuosas y arremolinadas dispuestas en íntima vecindad con la matriz extracelular.

Distribución de las Fibras Elásticas en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena con Lesiones Varicosas

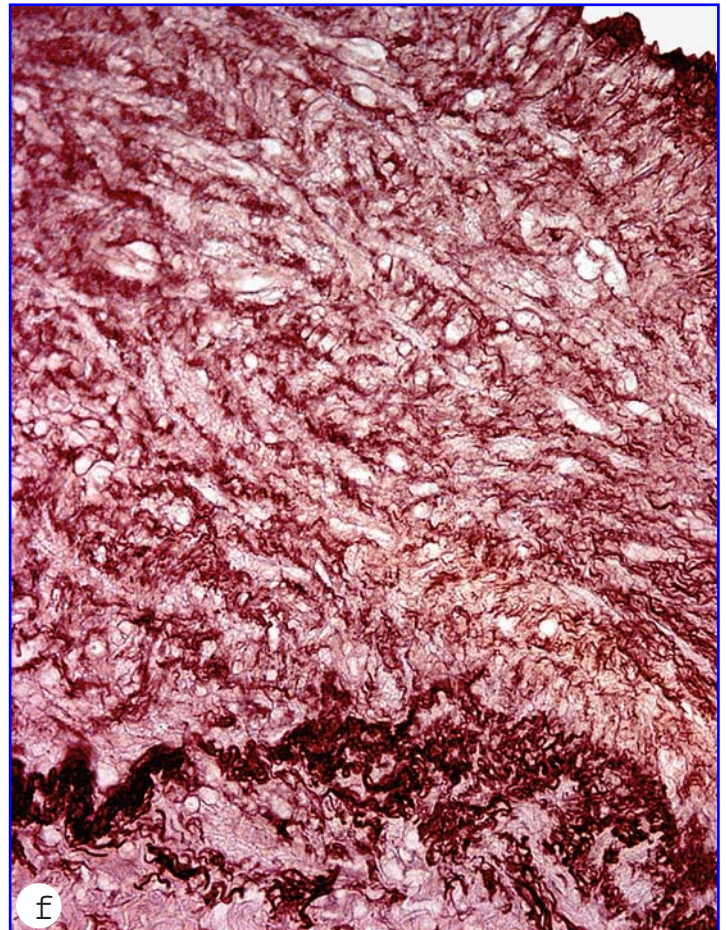
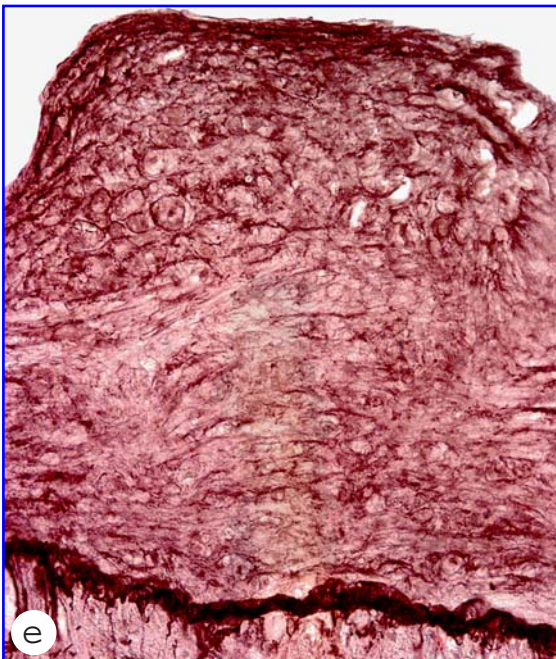
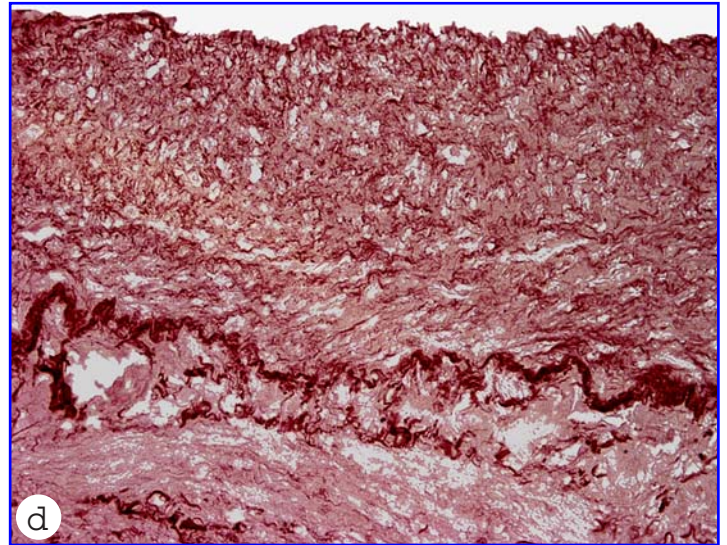
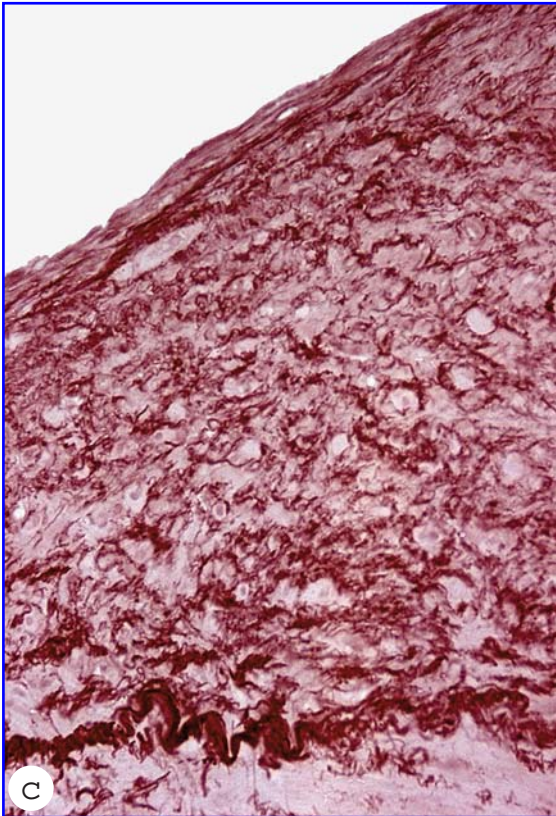
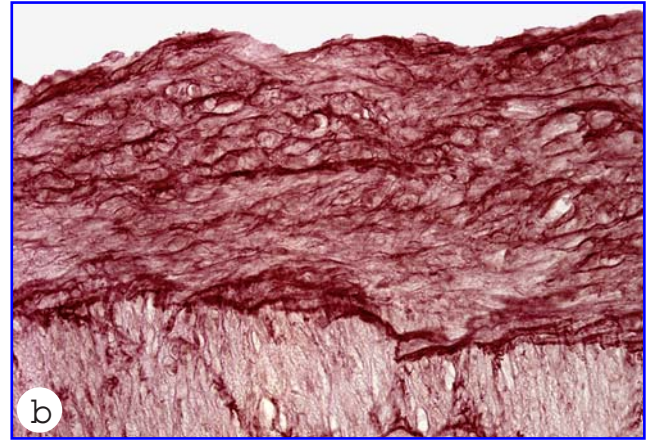
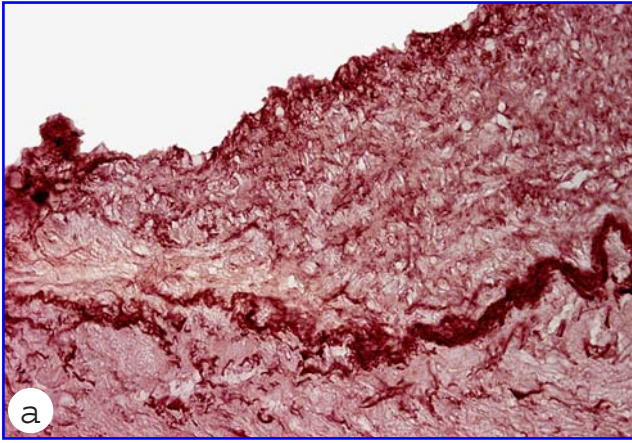
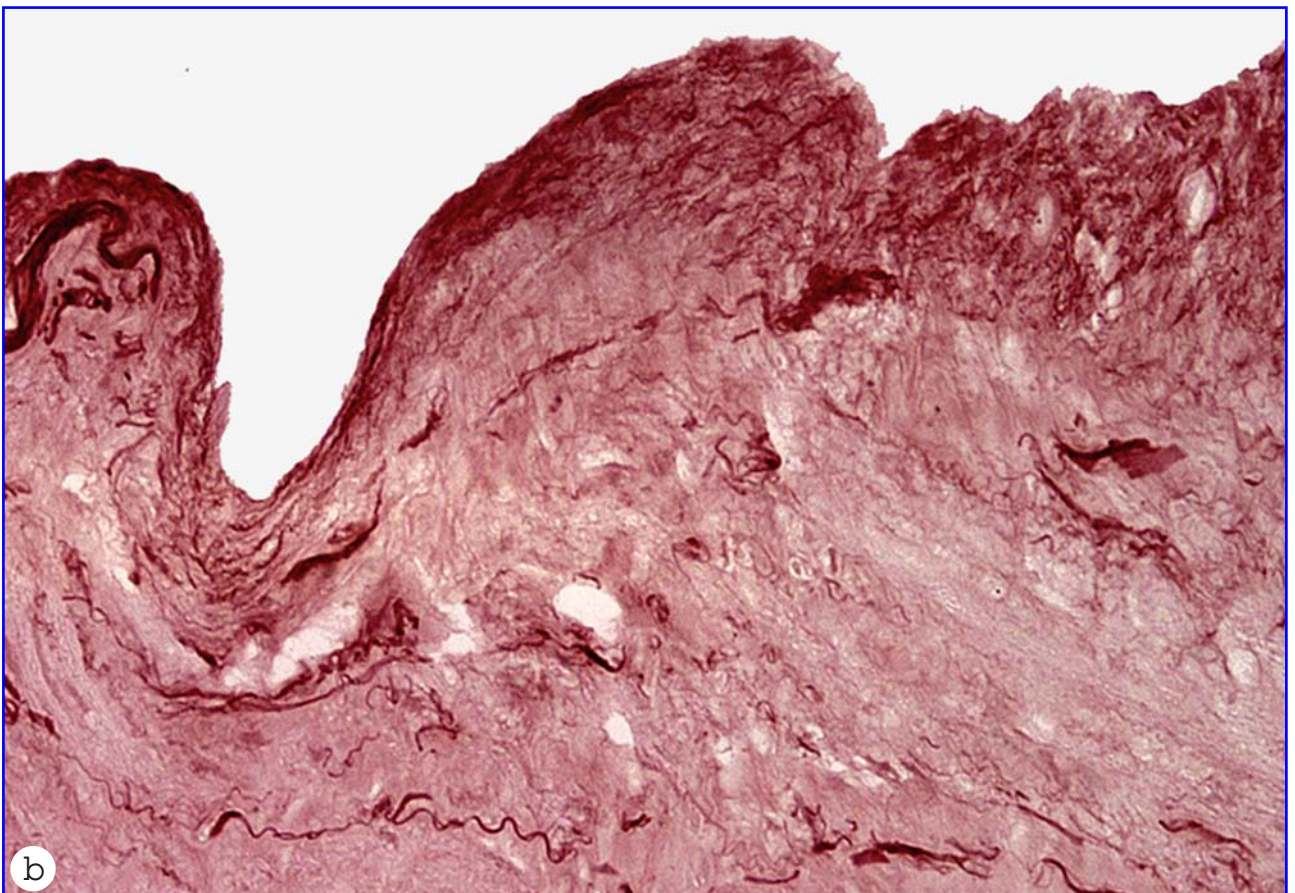
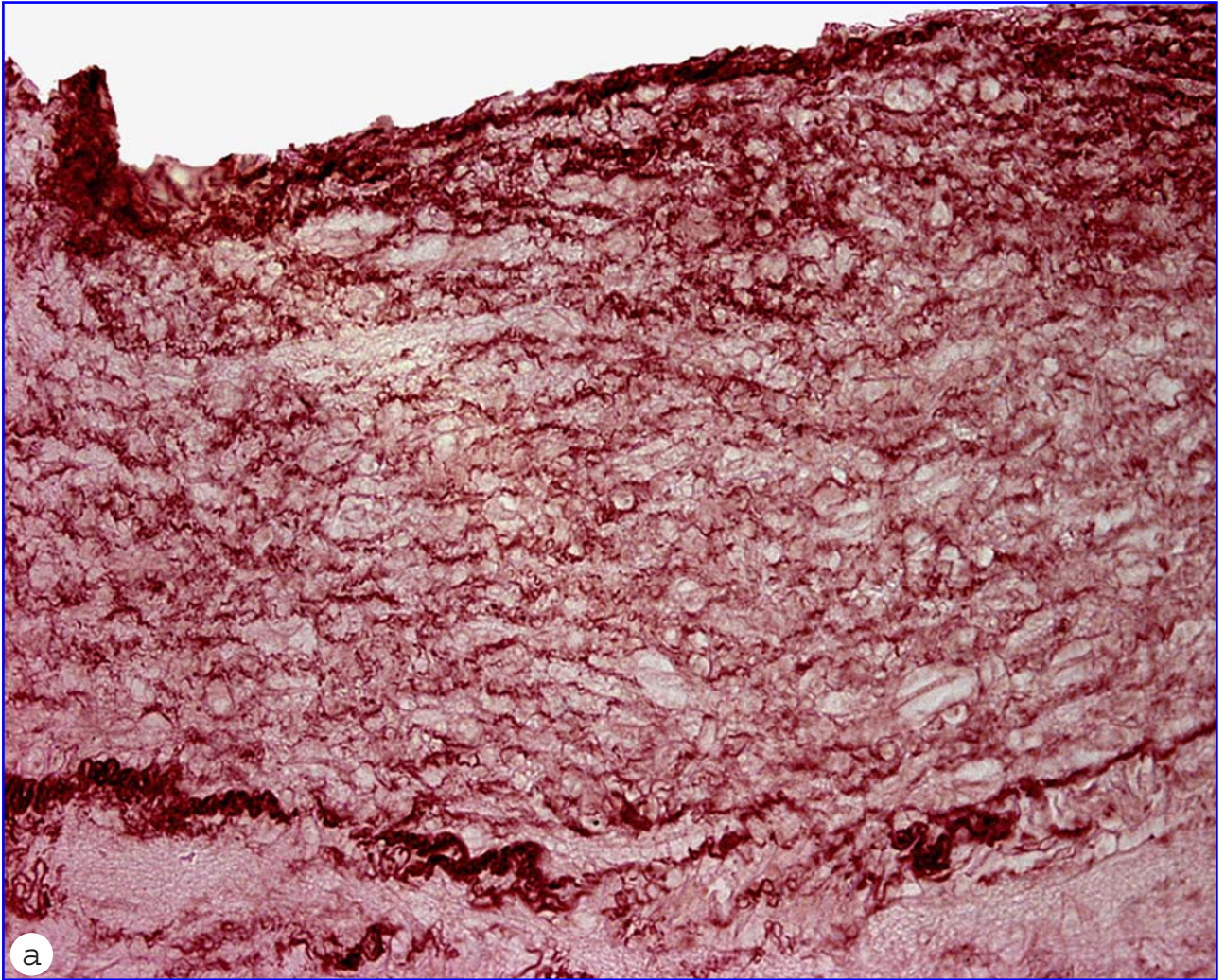


Figura 7. Distribución de las fibras elásticas en las capas íntima y media de la vena safena con lesiones varicosas

- a.** Extraordinario engrosamiento intimal en el que se aprecian fibras elásticas neoformadas, cortas y tortuosas, con tendencia a disponerse circunferencialmente. Próximo a la luz vascular, la superficie intimal contiene fibras elásticas más gruesas e intensamente teñidas. También se aprecia una lámina elástica interna intensamente teñida, aunque en múltiples zonas es discontinua. Adyacentemente en esta rotura se observa una capa media que contiene láminas elásticas muy irregulares.
- b.** La superficie intimal es rugosa, debido a una íntima con diferente grosor. La lámina elástica interna está rota y en muchas zonas ha desaparecido; no obstante quedan pequeños segmentos muy cortos intensamente teñidos con orceína. En la parte derecha de la imagen existe una evidente elastogénesis intimal. La capa media presenta una fibrosis subintimal en donde no se identifican fibras elásticas. Por debajo de este tejido fibrótico la capa media está más estructurada y contienen pequeñas láminas elásticas.

Distribución de las Fibras Elásticas en las Capas Íntima y Media de la Vena Ssafena con Lesiones Varicosas



CUANTIFICACIÓN HISTOMÉTRICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS

En la tabla 3 se incluyen los datos de la morfometría de la superficie ocupada por las células musculares lisas (SMA+) en relación al área total de la túnica íntima considerando cuatro grupos de altura de engrosamiento intimal.

Tabla 3. Superficie alfa actina muscular.

Altura Engrosamiento Intimal (μm)	Área Total Lesión Intimal (μm^2)	Área Alfa Actina Muscular (μm^2)	Proporción Actina/Área Total
1 a 14,9	2814,4 \pm 1140	966,9 \pm 484	0,34 \pm 0,06
15 a 49,9	12068,1 \pm 3723	2751,9 \pm 1529	0,26 \pm 0,05 ^a
50 a 99,9	24004,3 \pm 4310	5329,7 \pm 2477	0,21 \pm 0,07 ^a
> 100	58560,9 \pm 11069	8714,6 \pm 1642	0,15 \pm 0,03 ^a

a: $p < 0.05$ con respecto al anterior

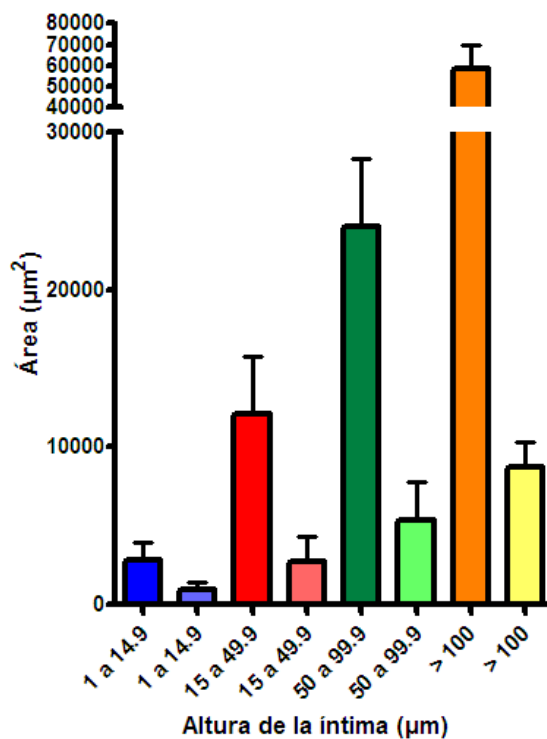


Figura 8. Área total de la íntima y área de la inmunoexpresión de alfa actina de músculo liso en los diferentes grados de engrosamiento intimal. Para cada grupo de altura de la íntima, la primera columna corresponde al área total intimal y la segunda columna indica el área de inmunomarcaje.

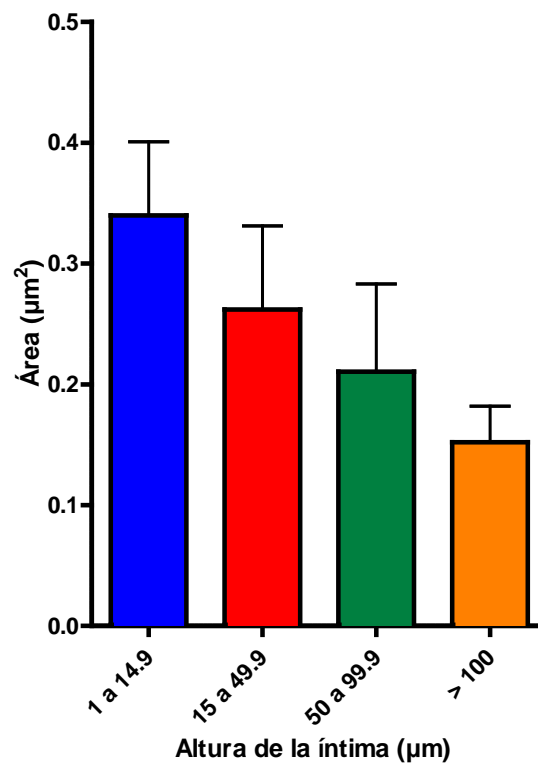


Figura 9. Proporción del área de la inmunoexpresión de alfa actina músculo liso en relación con el área total de la íntima en los diferentes grados de engrosamiento intimal.

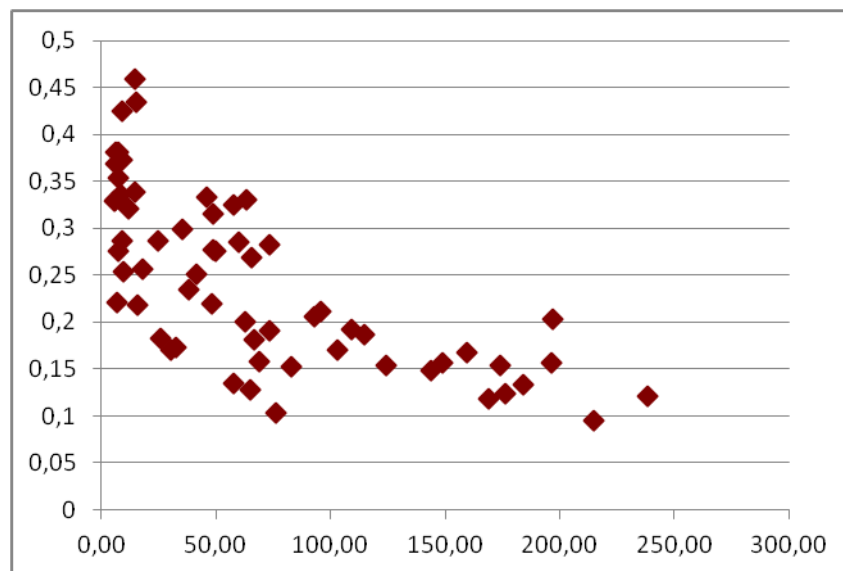


Figura 10. Distribución de la cuantificación del inmunomarcaje de alfa actina muscular en la íntima en relación a la superficie intimal total en cada uno de los casos estudiados.

CUANTIFICACIÓN HISTOMÉTRICA DEL COLÁGENO IV

En la tabla 4 se incluyen los datos de la morfometría de la superficie ocupada por el colágeno IV en relación al área total de la túnica íntima considerando cuatro grupos de altura de engrosamiento intimal.

Tabla 4. Superficie colágeno IV.

Altura Engrosamiento Intimal (μm)	Área Total Lesión Intimal (μm^2)	Área Alfa Actina Muscular (μm^2)	Proporción Actina/Área Total
15 a 49,9	6731,2 \pm 346	3233,3 \pm 1083	0,48 \pm 0,13
50 a 99,9	25054,5 \pm 4044	4614,9 \pm 1227	0,18 \pm 0,04 ^a
> 100	65308,9 \pm 11833	11690,9 \pm 4002	0,18 \pm 0,07

a: $p < 0,001$ con respecto al anterior.

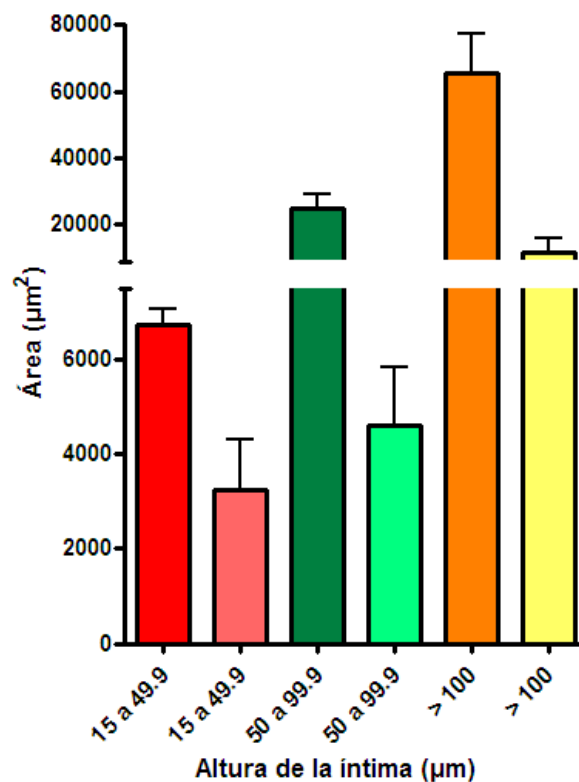


Figura 11. Área total de la íntima y área de la inmunoexpresión de colágeno IV en los diferentes grados de engrosamiento intimal. Para cada grupo de altura de la íntima, la primera columna corresponde al área total intimal y la segunda columna indica el área de inmunomarcaje.

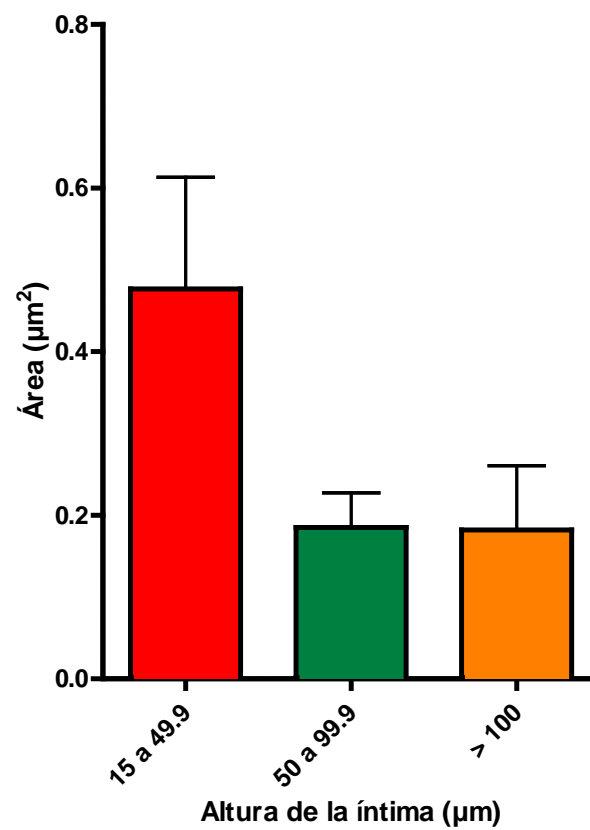


Figura 12. Proporción del área de la inmunexpresión de colágeno IV en relación con el área total de la íntima en los diferentes grados de engrosamiento intimal.

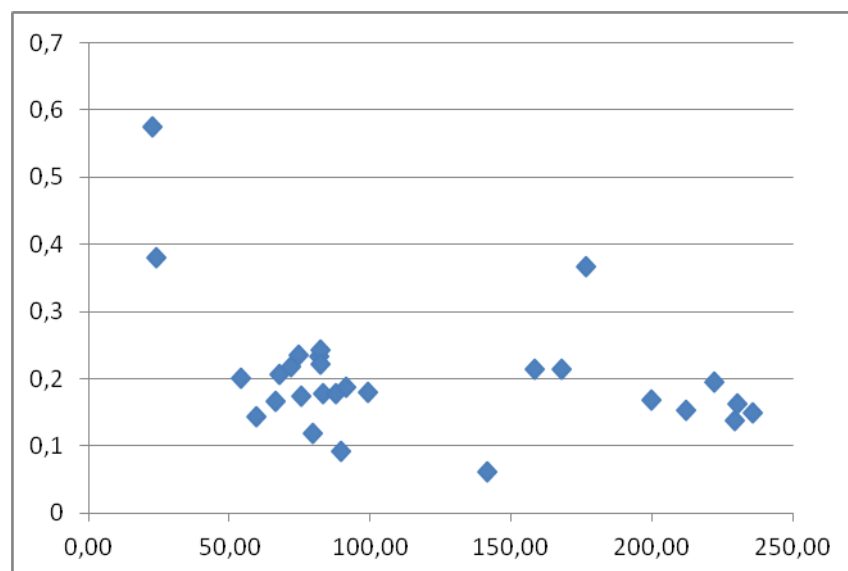


Figura 13. Distribución de la cuantificación del inmunomarcaje de colágeno IV en la íntima en relación a la superficie intimal total en cada uno de los casos estudiados.

CUANTIFICACIÓN HISTOMÉTRICA DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS

En la tabla 5 se incluyen los datos de la morfometría de la superficie ocupada por las fibras elásticas (orceína positivas) en relación al área total de la túnica íntima considerando cuatro grupos de altura de engrosamiento intimal.

Tabla 5. Superficie fibras elásticas orceína positivas.

Altura engrosamiento intimal (μm)	Área total lesión intimal (μm^2)	Área Alfa Actina Muscular (μm^2)	Proporción actina/área total
1 a 14,9	3176,1 \pm 688	1080,4 \pm 222	0,34 \pm 0,03
15 a 49,9	10332,3 \pm 2973	2951,0 \pm 823	0,29 \pm 0,05 ^a
50 a 99,9	25733,8 \pm 4510	4737,3 \pm 1133	0,19 \pm 0,04 ^b
> 100	54506,0 \pm 10011	6703,3 \pm 1951	0,12 \pm 0,03 ^b

a: $p < 0,05$ con respecto al anterior; b: $p < 0,001$ con respecto al anterior

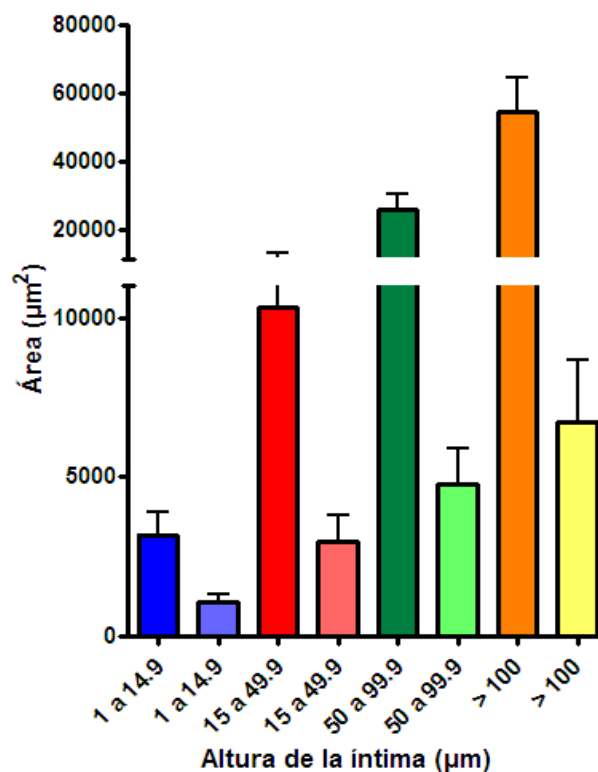


Figura 14. Área total de la íntima y área de las fibras elásticas orceína positivas en los diferentes grados de engrosamiento intimal. Para cada grupo de altura de la íntima, la primera columna corresponde al área total intimal y la segunda columna indica el área de ocupada por fibras elásticas.

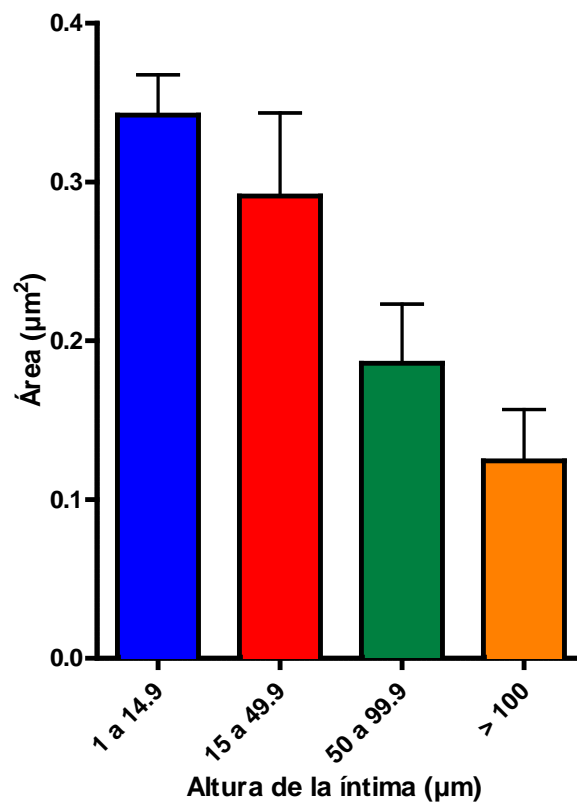


Figura 15. Proporción del área de las fibras elásticas orceína positivas en relación con el área total de la íntima en los diferentes grados de engrosamiento intimal.

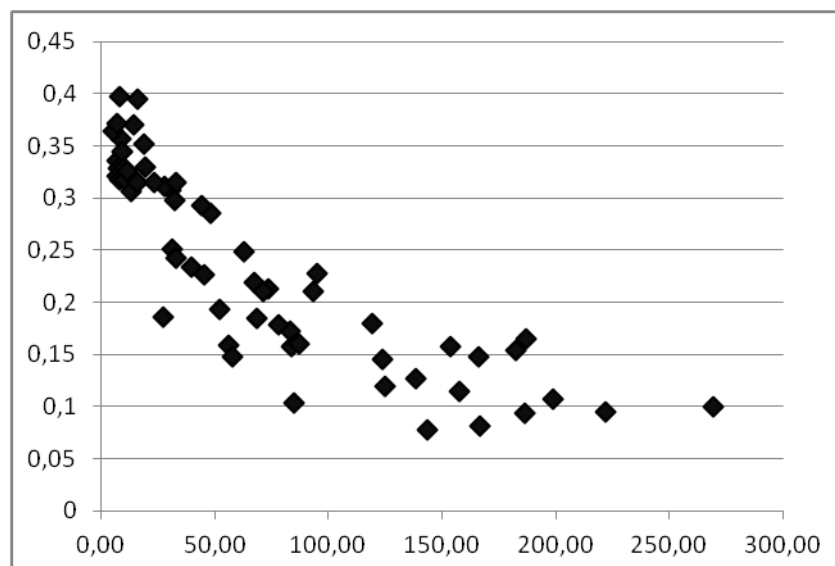
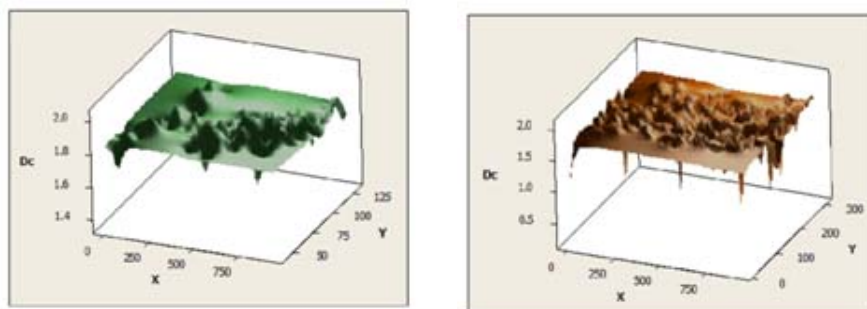


Figura 16. Distribución de la cuantificación de las fibras elásticas orceína positivas en la íntima en relación a la superficie intimal total en cada uno de los casos estudiados.

ESTUDIO DE FRACTALES

En el presente estudio de alteraciones de la íntima en la vena safena con IVC se ha realizado el estudio de fractales, análisis de la dimensión fractal y análisis multifractal, en las mismas preparaciones en las que previamente se cuantificaron las lesiones intimaes mediante el método de orceína.

Número Fractal



Análisis Multifractal

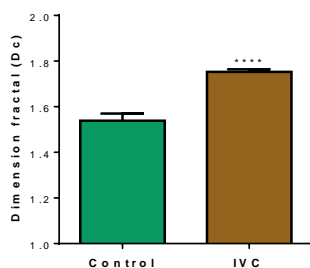


Figura 17. Variación tridimensional de la dimensión fractal (D_c) en la túnica íntima de venas Control no varicosas (en verde) y varicosas (IVC) (en marrón) teñidas con orceína. Promedio \pm Desviación estándar de los valores de D_c . **** refleja significación estadística $p < 0.001$.

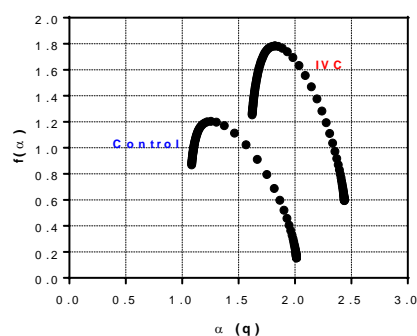
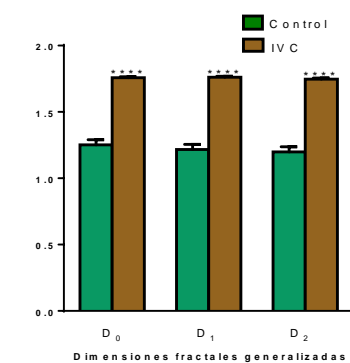


Figura 18. Análisis multifractal de la túnica íntima de venas control no varicosas y con insuficiencia venosa (IVC) obtenidas mediante tinción con orceína. El diagrama de barras representa el promedio \pm SD de las dimensiones fractales generalizadas D_0 , D_1 , D_2 . Espectro multifractal (imagen derecha) de una imagen representativa de las venas control y IVC. Donde $f(\alpha)$ es la dimensión fractal que corresponde a un exponente α que es función del ancho de la caja utilizado en el análisis multifractal. *** refleja significación estadística $p < 0.001$.

Figura 19. Análisis fractal y multifractal de la túnica íntima de venas control no varicosas y en las venas con insuficiencia venosa (IVC) teñidas con orceína

Izquierda. Muestra el cambio de la dimensión fractal en la relación con los diferentes grados de engrosamiento intimal.

Derecha. Refleja el espectro multifractal de la evolución del engrosamiento intimal de la IVC, obtenido de imágenes de la íntima de venas teñidas con orceína.

A. Vena Control no varicosa.

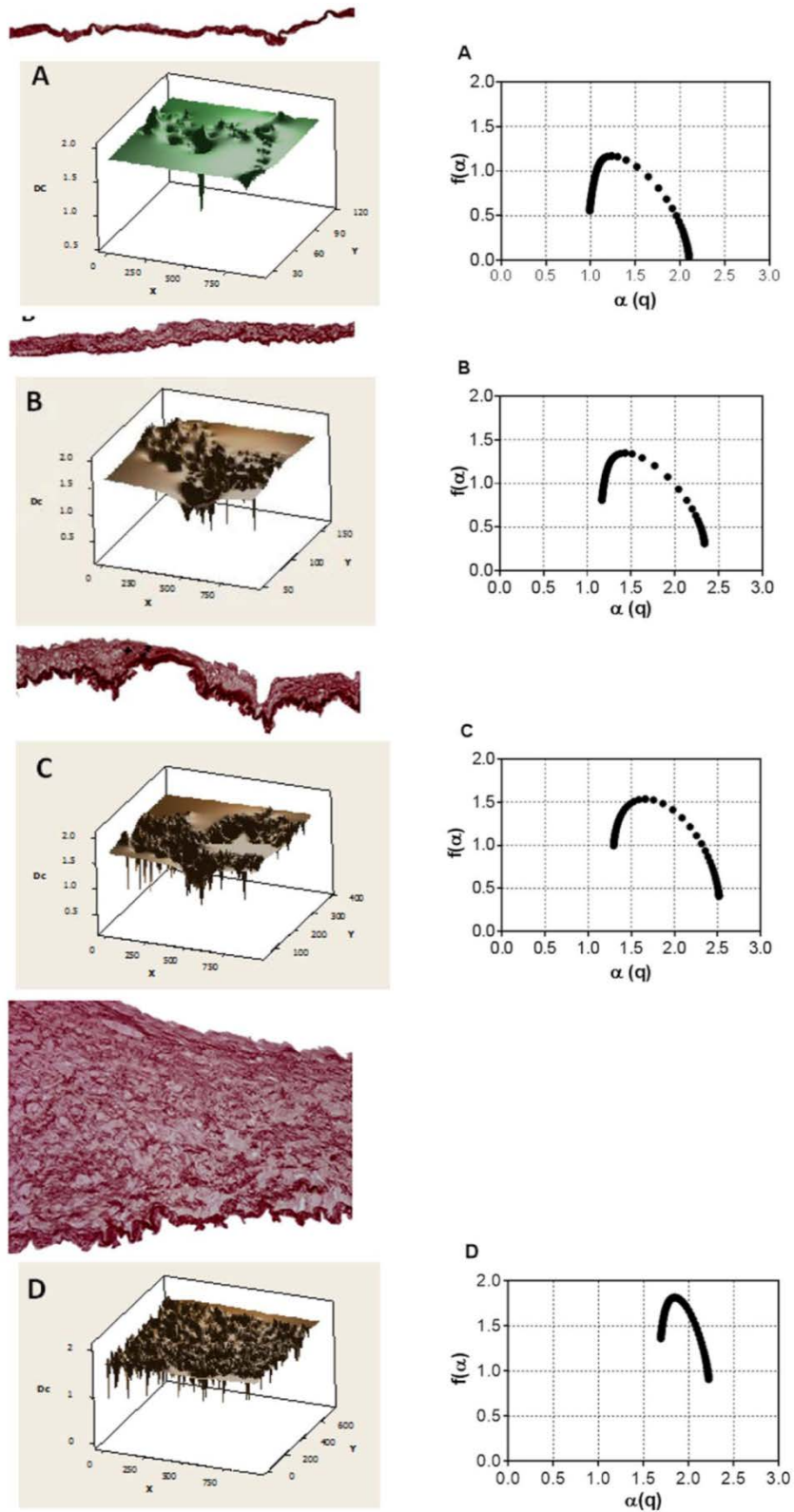
B. Venas con fibrosis inicial.

C. Venas con fibrosis moderada.

D. Venas con fibrosis intensa.

El punto máximo de las curvas de espectro incrementa con la evolución de la patología venosa, donde $f(\alpha)$ es la dimensión fractal, que corresponde a un exponente α , el cual es función del ancho de la caja utilizado en el análisis multifractal.

Número Fractal y Análisis Multifractal de Fibras Elásticas Orceína Positivas en Venas Normales y con Lesión Inicial, Moderada e Intensa Fibrosis Intimal



Análisis Fractales de la Autofluorescencia de Fibras Elásticas

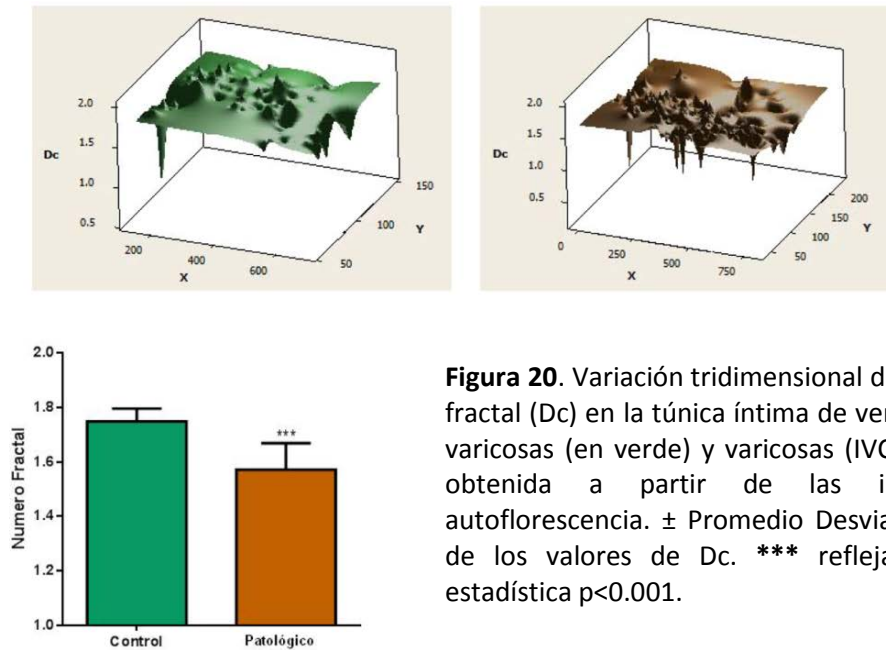


Figura 20. Variación tridimensional de la dimensión fractal (D_c) en la túnica íntima de venas Control no varicosas (en verde) y varicosas (IVC) (en marrón) obtenida a partir de las imágenes de autofluorescencia. \pm Promedio Desviación estándar de los valores de D_c . *** refleja significación estadística $p < 0.001$.

Análisis Multifractal

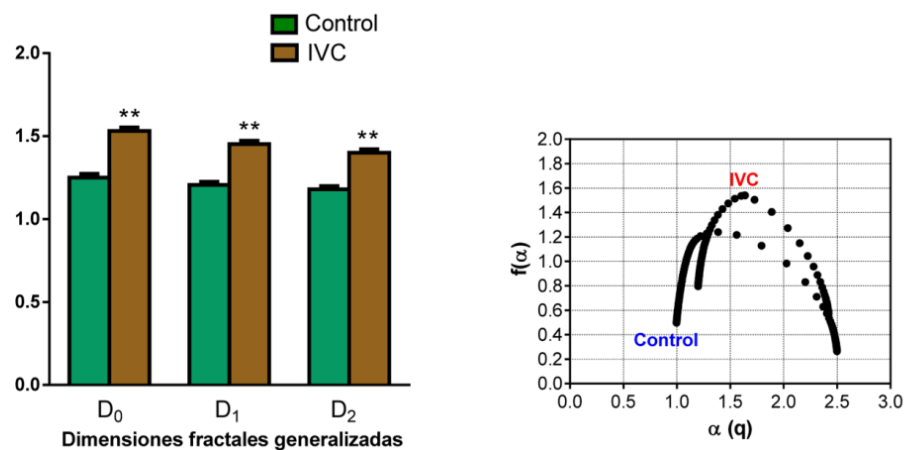


Figura 21. Análisis multifractal de la túnica íntima de venas control no varicosas y con insuficiencia venosa (IVC) de la imágenes de autofluorescencia. El diagrama de barras representa el promedio \pm SD de las dimensiones fractales generalizadas D_0 , D_1 , D_2 . Espectro multifractal (imagen derecha) de una imagen representativa de la venas control y IVC. *** refleja significación estadística $p < 0.001$. Donde $f(\alpha)$ es la dimensión fractal que corresponde a un exponente α , el cual es función del ancho de la caja utilizado en el análisis multifractal.

Figura 22. Análisis fractal y multifractal de la túnica íntima de venas control no varicosas y con insuficiencia venosa (IVC) obtenido de imágenes de autofluorescencia

- Izquierda.** Muestra el cambio de la dimensión fractal en función del plano de la imagen.
- Derecha.** Muestra el espectro multifractal de la evolución del engrosamiento intimal.
- A.** Vena Control no varicosa.
- B.** Venas con fibrosis inicial moderada.
- C.** Venas con fibrosis moderada.
- D.** Venas con fibrosis intensa.

El punto máximo de las curvas de espectro incrementa con la evolución de la patología venosa, donde $f(\alpha)$ es la dimensión fractal, que corresponde a un exponente α , el cual es función del ancho de la caja utilizada para el análisis fractal.

Número Fractal y Análisis Multifractal de Fibras Elásticas Autofluorescentes en Venas Normales y con Lesión Inicial, Moderada e Intensa Fibrosis Intimal

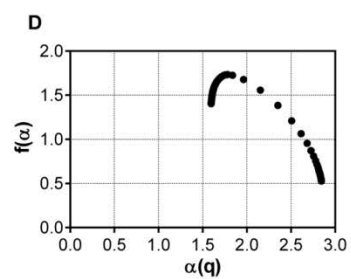
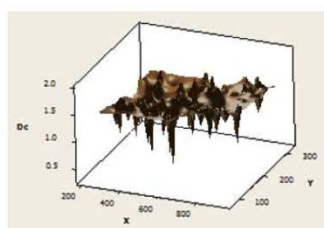
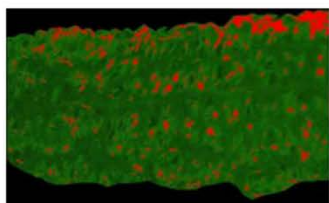
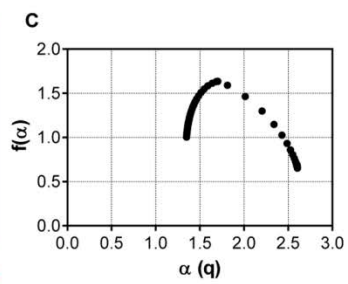
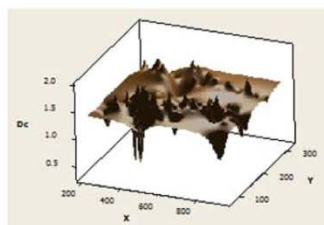
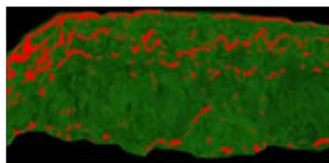
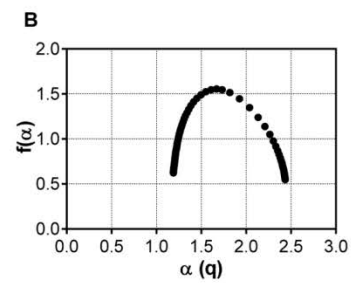
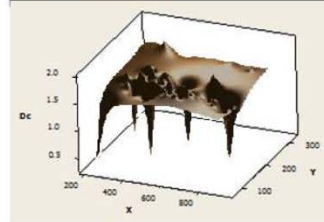
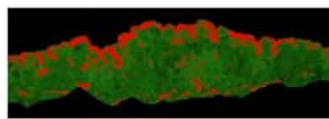
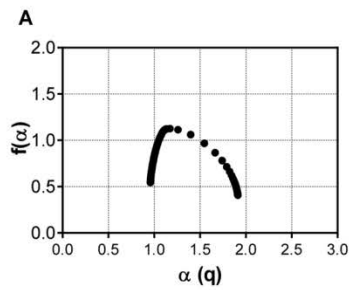
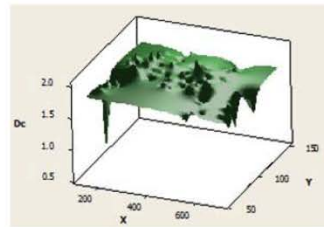
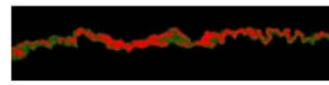


Tabla 6. Dimensiones fractales generalizadas de la túnica íntima de venas control no varicosas y con insuficiencia venosa (IVC) obtenidas de las imágenes teñidas con orceína y de autofluorescencia.

Fibras Elásticas en Íntima Venosa		Dimensión Fractal Generalizada D_0	Dimensión Fractal Generalizada D_1	Dimensión Fractal Generalizada D_2
Orceína	Venas Control no varicosas	$1,252 \pm 0,085$	$1,217 \pm 0,086$	$1,199 \pm 0,084$
	Venas con insuficiencia venosa	$1,759 \pm 0,042^a$	$1,761 \pm 0,043^a$	$1,747 \pm 0,046^a$
Autofluorescencia	Venas Control no varicosas	$1,251 \pm 0,083^a$	$1,206 \pm 0,069^a$	$1,181 \pm 0,068^a$
	Venas con insuficiencia venosa	$1,532 \pm 0,103^a$	$1,452 \pm 0,105^a$	$1,400 \pm 0,108^a$

a: $p < 0,01$ con respecto al anterior

CORRELACIÓN DE LA DIMENSIÓN FRACTAL CON LA ALTURA INTIMAL Y CON LA PROPORCIÓN RELATIVA DE LA SUPERFICIE DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS INTIMALES RESPECTO AL ÁREA TOTAL INTIMAL

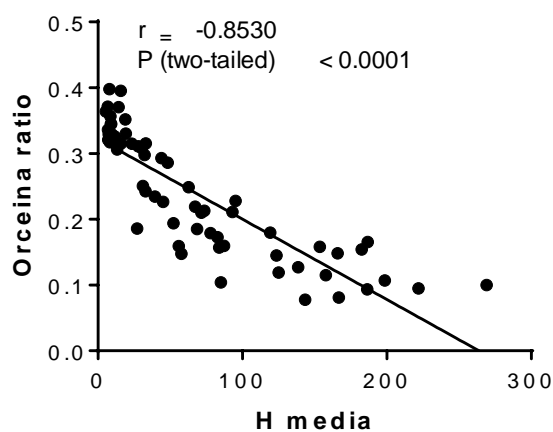


Figura 23. Correlación de la proporción relativa de la superficie de fibras elásticas en relación con la superficie de la túnica íntima de venas varicosas (orceína ratio) y la altura de la túnica íntima (H media). El valor negativo de r refleja una asociación inversa entre las variables y $p < 0.0001$ una alta significación estadística.

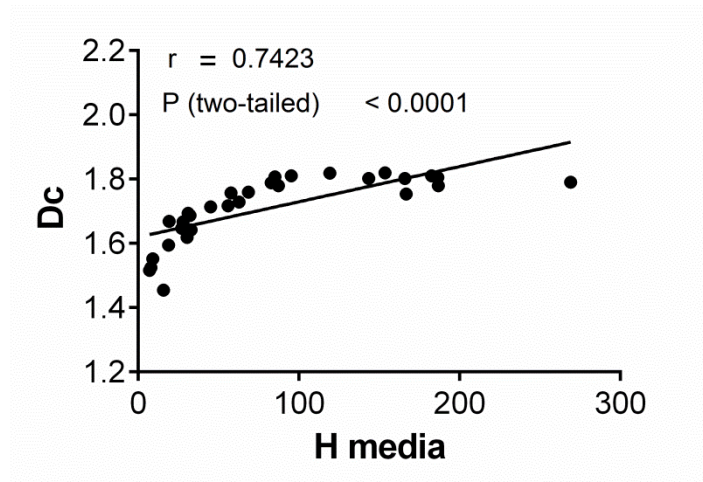


Figura 24. Correlación de la dimensión fractal (Dc) y la altura de la túnica íntima (H media) de venas varicosas obtenidas de muestras teñidas con orceína. El valor positivo de r refleja una asociación directa entre las variables y $p < 0.0001$ una alta significación estadística.

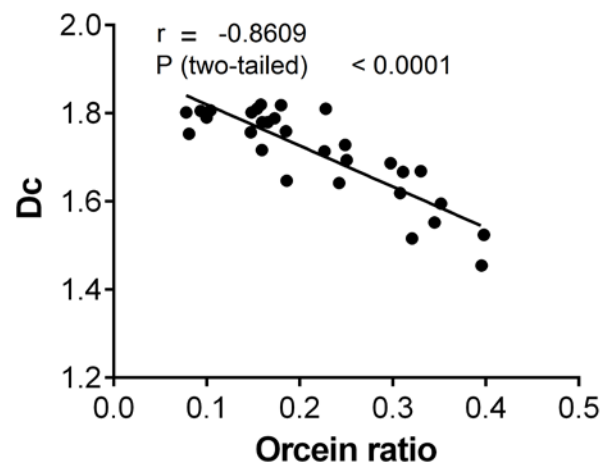


Figura 25. Correlación de la dimensión fractal (Dc) con la proporción relativa de la superficie de fibras elásticas en relación con la superficie de la túnica íntima de venas varicosas (orcein ratio). El valor negativo de r refleja una asociación inversa entre las variables y $p < 0.0001$ una alta significación estadística.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, centrado en los cambios iniciales de la íntima en los segmentos varicosos de la vena safena extirpada en pacientes con IVC grado 2-3 de la clasificación CEAP, se han valorado pormenorizadamente las características histológicas y algunos mecanismos moleculares que participan en la formación de la fibrosis intimal. Este estudio no sólo tiene un interés académico, si no que, al definir los patrones molecular y morfológico de estas lesiones intimaes, permitirá el diseño de nuevos estudios clínicos, histopatológicos y moleculares in vitro. Cabe la posibilidad de que estas investigaciones permitan la identificación de posibles dianas terapéuticas que eviten o disminuyan el daño vascular, lo que redundará en un beneficio para el paciente al poder alterar el proceso evolutivo de la IVC y en una disminución de los costes sanitarios.

En nuestro material comprobamos que, en los segmentos de pared de vena safena de apariencia macroscópica normal, el estudio histológico detallado permite visualizar áreas de íntima rigurosamente normal, revestidas por un endotelio plano y por un lámina propia de un grosor virtual; adyacentemente se pueden observar pequeñas irregularidades y engrosamientos intimaes, caracterizados por un fino depósito de tejido conjuntivo entre el endotelio y la lámina elástica interna. En estas áreas con mínimos cambios (espesor de la íntima inferior a 15 micras) también se pueden encontrar pequeñas fibras musculares lisas, dispuestas longitudinalmente, las cuales expresan SMA en su escaso citoplasma.

En estos segmentos con mínimos cambios intimaes los estudios morfométricos cuantitativos revelan que la superficie ocupada por todas las células musculares inmunomarcadas con anticuerpo anti-SMA es baja, si se compara con la superficie total intimal, evaluada en cada campo microscópico. Sin embargo, en este estadio más inicial de lesiones secundarias a IVC, cuando los datos se expresan en valores relativos del área ocupada por las células musculares lisas en relación con el área total intimal, se demuestra que aproximadamente el 35% del engrosamiento intimal corresponde a células musculares lisas; mientras que el resto de la superficie intimal está ocupada por la lámina elástica, y la matriz extracelular virtual subendotelial.

Se desconocen los mecanismos íntimos de esta proliferación y diferenciación de las células musculares lisas intimaes, pero estudios recientes han demostrado la participación

del endotelio vascular en la regulación de mecanismos de estrés oxidativo frente a alteraciones locales del flujo hemodinámico y de la presión intraluminal, los cuales pueden modificar la composición de la pared venosa.^{135,253} Moléculas ROS relacionadas con el estrés oxidativo es posible que pudieran regular la proliferación y diferenciación de células intimales de la pared venosa, las cuales se transformarían en miofibroblastos y células musculares lisas, presentes en las fases iniciales de la fibrosis intimal varicosa. Pero también cabe especular que la presencia de células musculares lisas SMA+ encontradas en la íntima engrosada procedieran en parte de la migración de los leiomiocitos de la túnica media vascular.

Está bien establecido que en el mantenimiento del tono de la pared de la vena safena es fundamental una correcta actividad contráctil del músculo liso.⁸⁰ Es posible que mínimos cambios hemodinámicos locales, derivados del éstasis venoso y de la hipertensión secundaria, son suficientes para provocar un estrés en la pared, lo cual puede determinar cambios fisiopatológicos que den lugar al inicio de mecanismos de remodelación de la túnica íntima. Estos cambios hemodinámicos dan lugar a unas fuerzas biomecánicas determinadas por el flujo sanguíneo, la presión intra y extraluminal y las diferentes cargas tensionales que actúan en cada segmento comprendido entre dos válvulas; todos estos mecanismos son los responsables de que las lesiones varicosas a lo largo de la misma vena sean multifocales y de diferente intensidad.²²⁹

Las fuerzas biomecánicas son, de una parte, la fuerza de fricción de la sangre que actúa sobre el endotelio y, de otra, la tensión circunferencial que actúa sobre el endotelio, sobre las células musculares lisas de la íntima y de la media y sobre los fibroblastos de la adventicia. Estas fuerzas biomecánicas inducen inflamación por la interacción entre el endotelio y los leucocitos circulantes. Es más, estas modificaciones del tono vascular producen cambios de señalización de las células endoteliales y liberación de moléculas bioactivas hacia el tejido conjuntivo intimal. También el endotelio venoso secreta endotelinas, las cuales mantienen el tono vascular en individuos normales y en pacientes con enfermedad varicosa.¹³³ Además, se ha comentado que en la formación de varices pueden participar moléculas que regulan la relajación vascular, como la forrelaxin-2,2

reduciendo la contracción muscular en respuesta a noradrenalina, lo que sugiere una evidente alteración de la respuesta contráctil del músculo liso.¹³

Sin duda estos cambios funcionales que ejercen modificaciones iniciales del flujo y de la presión intraluminal posiblemente sean los que desencadenan los primeros cambios de la matriz extracelular de la íntima (tal como se ha demostrado en la íntima en modelos de hipertensión arterial^{140,141}), con inicio del incremento de su espesor y diferenciación de células musculares lisas SMA+; por ello, ya desde estas fases iniciales subclínicas se produce una progresiva desestructuración y modificación molecular de los segmentos de pared venosa con lesiones varicosas.^{135,253}

Los altos valores del ratio ocupado por el músculo liso en la fase más inicial de la formación de varices indican la importancia que tiene en el desencadenamiento del engrosamiento intimal, aunque es muy difícil conocer si las células musculares SMA positivas localizadas en la íntima son el resultado de una migración del músculo liso de la porción más superficial de la capa media venosa, dado que en la formación de la neoíntima en la aorta de roedores se ha observado la capacidad de migración del músculo liso vascular;²¹⁵ pero también cabe la posibilidad de que las células musculares lisas intimaes presentes en las lesiones iniciales varicosas se puedan originar de novo, como un proceso de proliferación y diferenciación de células totipotenciales intimaes (posiblemente células madre con capacidad prospectiva para transformarse en miofibroblastos y después en células musculares lisas). Esta hipótesis es verosímil, ya que estudios previos han demostrado que las células musculares lisas vasculares tienen capacidad proliferativa en situaciones patológicas, participando en mecanismos de reparación de los vasos sanguíneos.¹³⁹

La valoración morfométrica de la íntima de las venas varicosas estudiadas demuestra que, a medida que avanza el engrosamiento intimal, existe un significativo aumento de los valores absolutos del área ocupada por las células musculares lisas SMA+, sobre todo a partir de un grosor intimal superior a 50 micras, cuando la lesión varicosa intimal está completamente establecida y ya es posible visualizarla macroscópicamente o registrar con el eco-doppler inversión del flujo de más de 0,5 segundos de duración.^{115,214} Pero además, este

incremento de células SMA+ es mucho más evidente cuando el engrosamiento intimal aumenta progresivamente (altura intimal comprendida entre 100 y 300 μm).

En estos casos de lesiones varicosas completamente establecidas, histológicamente se ve una importante heterogeneidad del tamaño, orientación y densidad de las células musculares lisas, de modo que, existen áreas en las que la íntima contiene abundantes leiomiocitos hipertróficos, con extensa expresión de SMA, y dispuestos longitudinalmente, hasta otros campos microscópicos en los que las células musculares SMA+ son menos abundantes, tienen escaso citoplasma y están rodeadas por amplias áreas de la matriz extracelular del tejido conjuntivo.

Estos hallazgos histológicos quedan corroborados en el estudio morfométrico, en el que se demuestra que la proporción entre el área ocupada por las células SMA+ y el área total de la íntima disminuye a medida que aumenta el engrosamiento intimal. Estos datos, en parte, están en consonancia con estudios *in vitro* que han encontrado que las células de músculo liso derivadas de venas safenas varicosas están más desdiferenciadas y muestran un aumento de la capacidad proliferativa y de síntesis de proteínas, en comparación con la observada en las células musculares de venas normales, pasando de un fenotipo contráctil a uno secretor.²³⁶ Se ha sugerido que estos mecanismos pudieran contribuir a la remodelación de la pared venosa y al debilitamiento de su capacidad funcional, debido al estrés mecánico que sufre la vena safena en pacientes con IVC.²³⁶

Los mecanismos que participan en la fibrosis intimal han sido ampliamente estudiados, sobre todo en el sistema vascular arterial en pacientes con arteriosclerosis o con hipertensión. Se sabe que en la fase inicial de la producción de la placa de ateroma, el engrosamiento intimal está, en buena parte, determinado por la proliferación de células miointimales y por su mayor capacidad de síntesis de colágenos, fibras elásticas y matriz extracelular.

De modo bastante semejante, en las venas con lesiones varicosas, la proliferación y la hiperfunción muscular también ocurre en las fase iniciales del engrosamiento intimal; aunque la patobiología de la lesión intimal de las venas difiere de la observada en las

arterias, en las que es muy evidente la participación del incremento de lípidos circulantes¹⁹⁸ y de la regulación del metabolismo lipídico sistémico, como la lesión fundamental desencadenante de mecanismos de aterogénesis, los cuales quedan abolidos por la acción inhibitoria que tiene la bilirrubina en el depósito de lípidos en la neoíntima arterial.¹⁸¹ Sin embargo, hasta el momento presente se desconoce si en las lesiones intímicas venosas también influyen los cambios del metabolismo lipídico.¹⁸¹

En la formación de la neoíntima, tanto en patologías arteriales, venosas primarias y también en los injertos vasculares autólogos,²⁰⁵ intervienen procesos de óxido reducción dando lugar a una activación de mecanismos enzimáticos que regulan facilitando o inhibiendo la formación de dicha neoíntima.²⁰⁵ Las alteraciones de la pared venosa en pacientes con IVC pueden estar desencadenadas por mecanismos de estrés oxidativo, los cuales, tal como se ha demostrado en arterias de elevada resistencia, determinarían alteraciones estructurales y moleculares de las fibras elásticas, que dificultarían los mecanismos de reparación y de remodelación vascular.⁵¹

En relación con el estrés oxidativo, las células endoteliales participan en la regulación de ROS y de este modo participan en los mecanismos de tipo inflamatorio que experimentan las células endoteliales y las células musculares lisas de la pared vascular.¹⁰³ Está demostrado que en los pacientes con IVC se produce un estado de hipertensión vascular venosa, secundario al estasis venoso, lo cual puede desencadenar mecanismos proinflamatorios y liberación de interleucinas, tal y como se ha señalado en otras situaciones de alteraciones hemodinámicas vasculares que cursan con hipertensión.⁶ Por tanto, el endotelio experimenta cambios funcionales y estructurales secundarios al estrés oxidativo y al proceso inflamatorio.

Estas alteraciones endoteliales han sido ampliamente estudiadas en las fases iniciales de las lesiones ateroscleróticas y también en los mecanismos de endotelización de la neoíntima presente en los injertos vasculares;²⁴⁵ así mismo, en modelos experimentales de hipertensión venosa crónica (hipertensión portal) se ha demostrado el desencadenamiento de un estrés oxidativo de la pared vascular.⁶³ Sin embargo, en la pared varicosa el estudio de la participación de alteraciones endoteliales en la formación inicial de la neoíntima no han

sido bien investigados; no obstante, se sabe que en los mecanismos de fibrosis de la capa media de venas con varices participan linfocitos T y macrófagos; así mismo se ha demostrado que en la adventicia y en las áreas fibrosadas de la capa media vascular existe un incremento de fibras nerviosas no mielinizadas S100+.²³⁹

Además, en las lesiones de fibrosis intimal vascular existe una estrecha relación entre las células musculares lisas (células mioides o miofibroblastos intimales) y la matriz extracelular. Se sabe que células musculares lisas están rodeadas por una lámina basal de colágeno IV +, de modo que durante las diferentes fases de la miogénesis se va a ir secretando, no solo el colágeno IV, sino también otros tipos de colágeno del tejido conjuntivo, fundamentalmente colágeno I, y proteínas de la matriz extracelular amorfa. Por ello en la íntima venosa, ya desde los primeros momentos de fibrosis intimal y como respuesta a los cambios hemodinámicos de la vena safena en pacientes con IVC, la progresiva diferenciación de leiomiocitos intimales se va a acompañar de un incremento del colágeno IV.

En este sentido, se ha demostrado que el músculo liso vascular tiene la capacidad de remodelar el colágeno de la matriz extracelular;²³² además, las células musculares lisas vasculares (y también las presentes en el tubo digestivo y en el miometrio) tienen capacidad de secretar proteínas de la matriz extracelular, participando en mecanismos de remodelación del tejido conjuntivo.²⁴ El depósito de fibronectina en el tejido conjuntivo de la íntima engrosada de venas varicosas y, sobre todo, en el intersticio que rodea a los fascículos de músculo liso de la capa media venosa puede modificar la actividad funcional de las células musculares lisas de la pared venosa.⁴³

En las lesiones con evidente engrosamiento intimal, también se observa un incremento del tejido conjuntivo que rodea a las fibras musculares lisas; además en estos casos, frecuentemente, disminuyen de tamaño los leiomiocitos intimales, los cuales son progresivamente sustituidos por más matriz extracelular y colágenos en la porción más superficial de los segmentos intimales engrosados.¹⁵¹ Esta progresiva atrofia de las células musculares lisas de la íntima venosa fibrosa sigue unos cambios morfológicos semejantes a los descritos para procesos degenerativos de las capas musculares lisas presentes en la

senectud, y se caracterizan por una disminución del tamaño del citoplasma de los leiomiocitos de la pared venosa y una disminución de la expresión de SMA, asociándose a un incremento significativo del espacio intersticial, en el que se evidencia una progresiva fibrosis que, a su vez, también interviene, cerrándose el círculo patogenético de la atrofia del músculo liso.¹⁹⁷ En definitiva, en los pacientes con IVC, el incremento de la hipertensión venosa determina fibrosis de la pared vascular, con incremento de la síntesis de colágeno.¹⁷⁵

Cuando la íntima venosa está muy fibrosada, tal como se ha demostrado en la presente tesis, los dos tercios superiores están completamente ocupados por matriz extracelular del tejido conjuntivo, aunque, en ocasiones, se puede ver focalmente la presencia de células fusiformes que presentan muy escaso citoplasma, fundamentalmente miofibroblastos que co-expresan filamentos intermedios de vimentina y también la proteína SMA.

Cabe la posibilidad de que estas células mioides fueran el resultado de una máxima atrofia de leiomiocitos intinales, o bien fueran células activas funcionales con la capacidad de la síntesis de colágeno y proteínas de matriz que determinan la fibrosis intimal. Para resolver estos mecanismos serían necesarios nuevos estudios que incluyeran el cultivo in vitro de esta porción superficial de la íntima engrosada, los cuales permitirían identificar, por métodos de inmunofluorescencia o de inmunoperoxidasa,¹⁵³ el inmunofenotipo de las moléculas implicadas en la fibrosis de la íntima venosa en pacientes con IVC.

La matriz extracelular, incluida la presente en la capa íntima y en la capa media de las venas normales y varicosas, contiene una evidente proporción de metaloproteínas y una variable actividad de diferentes metaloproteinasas (MMP);^{44,69,217,240} así mismo, la proporción de los diferentes tipos de colágenos estructurales (sobre todo colágeno I y colágeno III) varían de un órgano a otro y, sobre todo, cambian sustancialmente en situaciones patológicas relacionadas con mecanismos de fibrosis y reparación tisular.

En relación con las áreas de fibrosis, tanto en modelos experimentales como en distintas patologías humanas fibrogénicas, frecuentemente se observa un incremento del colágeno tipo III que se dispone alrededor del músculo liso vascular²⁰⁹ o visceral.¹⁷³

Con el fin de estudiar más pormenorizadamente los mecanismos iniciales de la extensa fibrosis intimal en los segmentos varicosos, sobre todo en las zonas más superficiales de la íntima venosa engrosada, en la presente Tesis se ha realizado un estudio preliminar de la inmunoeexpresión de colágeno I y de colágeno III en algunos casos con íntima venosa engrosada (pendiente de cuantificación en posteriores trabajos).

De este modo hemos encontrado que en el desarrollo de las lesiones iniciales de la enfermedad varicosa, el progresivo engrosamiento intimal, no solo se debe al depósito de proteínas de la matriz extracelular y de un incremento del colágeno IV, tal como se ha cuantificado en el presente estudio, sino también al depósito de colágeno I, como principal colágeno estructural del tejido conjuntivo intimal y a depósitos de colágeno tipo III.

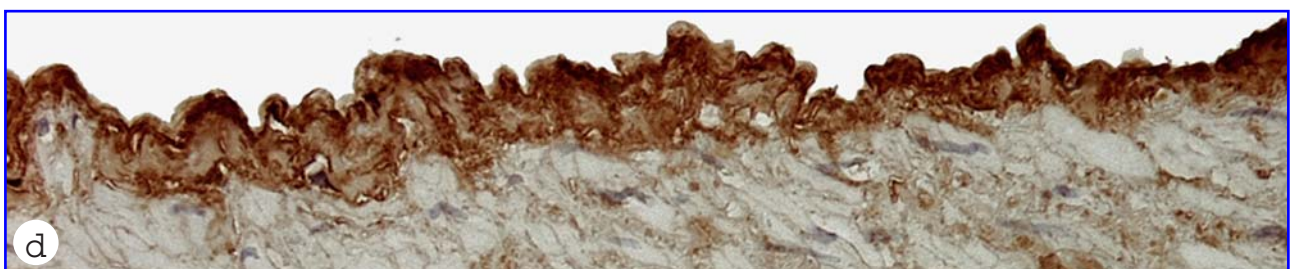
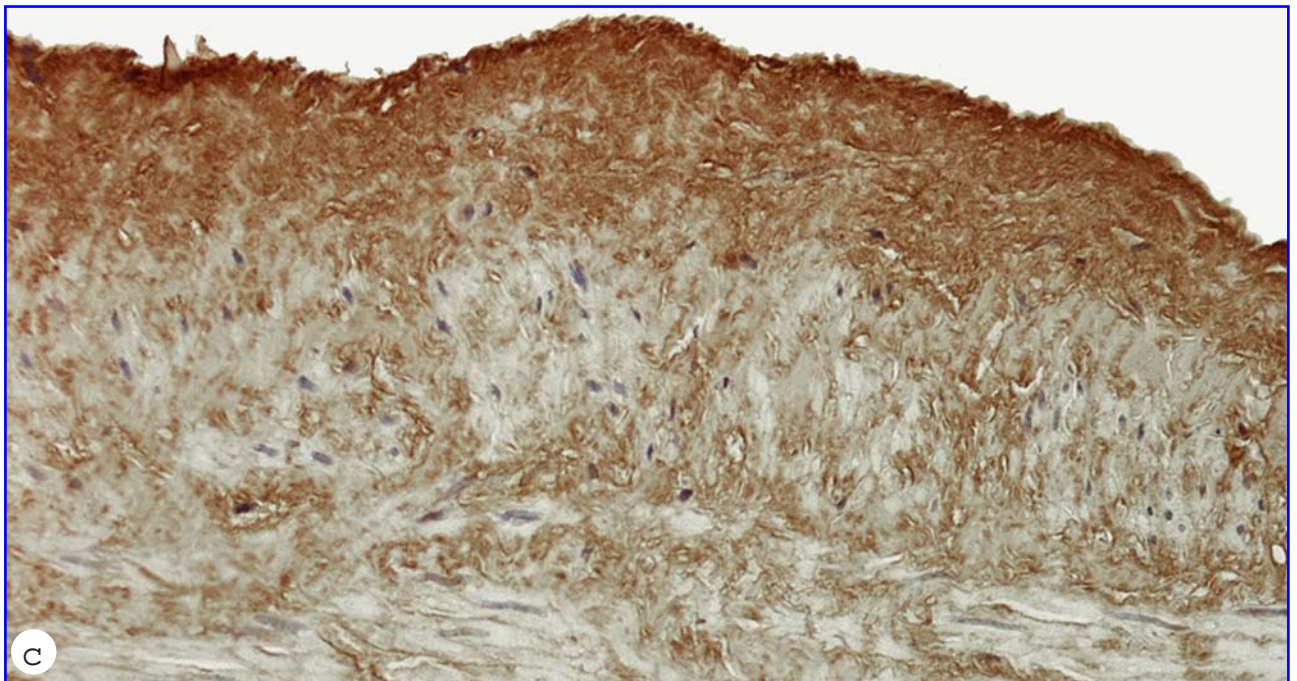
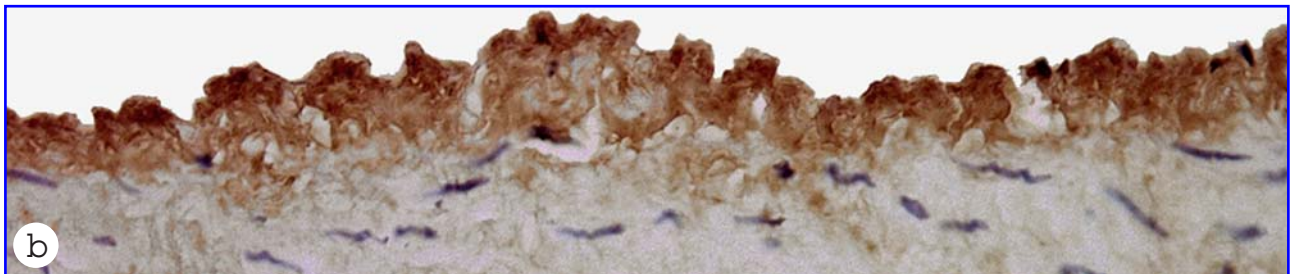
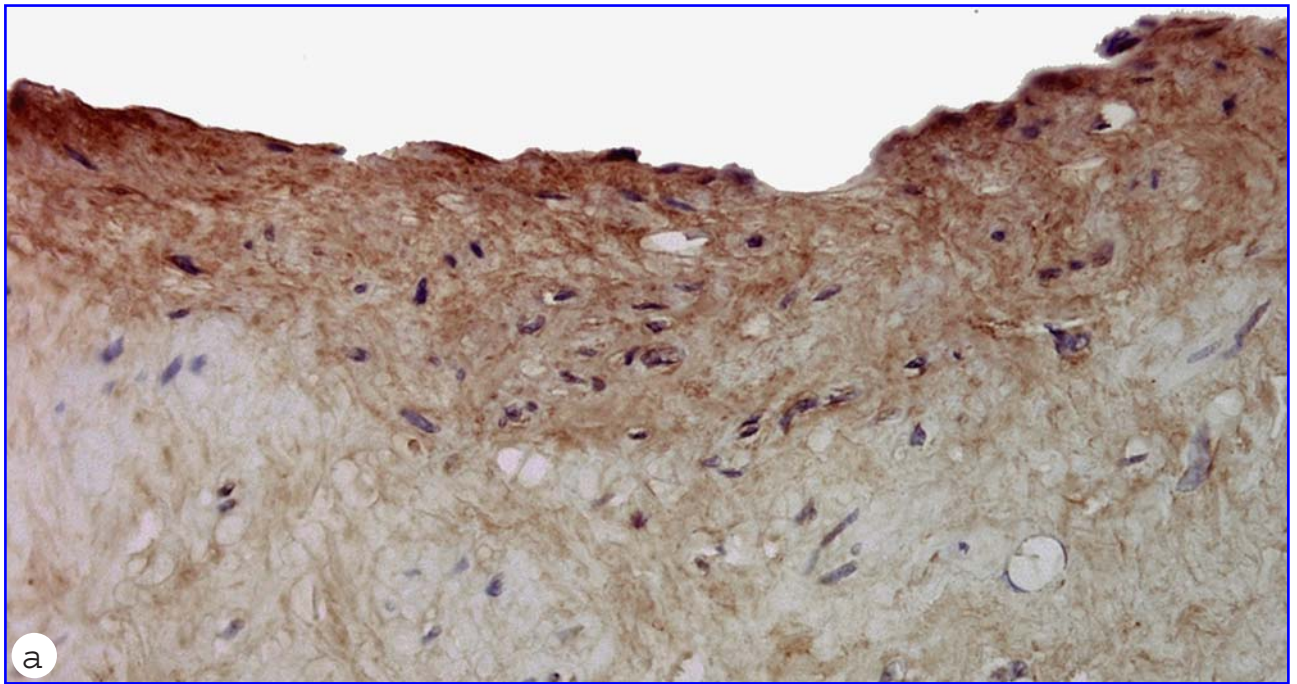
Ambos tipos de colágeno se expresan en toda la altura de la íntima, pero es más evidente en la porción superficial y media de los casos con evidente engrosamiento intimal, además, aunque son necesarios nuevos estudios histológicos e inmunohistoquímicos, la expresión de colágeno III es muy intensa en el tercio más superficial del engrosamiento intimal, formando una banda de tejido fibroso homogéneo y muy denso de colágeno III sobre la que se apoya el endotelio venoso (figura 25), lo que impide un correcto intercambio de metabolitos en la pared venosa varicosa y lo que determina cambios hemodinámicos irreversibles del flujo venoso en los pacientes con IVC.

La participación del depósito de colágeno I y colágeno III en la íntima fibrosada de las venas varicosas es un proceso que una vez instaurado modifica sustancialmente todos los componentes de la matriz extracelular, incluido el metabolismo de los glicosaminoglicanos, de las metaloproteínas y de la actividad de los diferentes tipos de metaloproteinasas. Estos procesos de fibrogénesis han sido ampliamente estudiados en otros órganos, como el hígado o la piel, en los que se ha demostrado que el depósito de colágeno I, pero sobre todo de colágeno III, determinan una fibrosis permanente e irreversible, tal como se ha observado en la fibrosis hepática y en las enfermedades esclerosantes del dermis cutáneo.

Figura 25. Expresión de Colágeno I y III en pared venosa

- a.** Intensa expresión Colágeno I en intima fibrosada.
- b.** Colágeno I en vena normal.
- c.** Intensa expresión Colágeno III en intima fibrosada.
- d.** Colágeno III en vena normal.

Expresión de Colágeno I y Colágeno III en las Capas Íntima y Media de la Vena Safena con Lesiones Varicosas



Las fibras elásticas han sido ampliamente estudiadas en el sistema vascular arterial normal, pero aún más en segmentos de aorta y arterias musculares en pacientes con arteriosclerosis y en las arterias de fino calibre y arteriolas que constituyen la microcirculación, en pacientes con diabetes mellitus¹⁸⁷ o con homocistinuria,¹⁹ en los que se han encontrado alteraciones de los mecanismos de remodelación de las fibras elásticas.

En relación con los mecanismos de elastogénesis, se ha demostrado que, en la pared arterial y también en la pared venosa, las fibras musculares lisas tienen la capacidad de sintetizar fibras elásticas;¹¹ por ello, la elastogénesis observada en las lesiones intimaes de venas varicosas es un proceso que, en las fases más iniciales, suele relacionarse con la hipertrofia de fibras musculares lisas intimaes vistas en el presente trabajo.

Las alteraciones de las fibras elásticas en la íntima venosa son muy importantes, ya que en la íntima lo que se observa son fibras muy cortas y depósito de material elástico amorfo. Estos datos contrastan con los hallazgos de hipertensión en arterias musculares de pequeño calibre, en los que las láminas elásticas permanecen circunferenciales concéntricas, pero lo que se incrementa es el tamaño de las fenestras, soluciones de continuidad características de las láminas elásticas arteriales.⁹ De hecho, en las arterias de resistencia, esto es, en arterias musculares finas y arteriolas de pacientes o de modelos experimentales de hipertensión, se han demostrado lesiones degenerativas irreversibles de las láminas elásticas de su pared,¹² lo que también ocurre en la íntima engrosada de venas con varices, en las que se ve un depósito de material elástico y fibras cortas, tortuosas y de fino calibre. Estudios ulteriores con microscopia confocal permitirán comparar las similitudes y diferencias entre las lesiones con incremento de fenestras en las láminas elásticas en la hipertensión arterial y los mecanismos de elastogénesis y elastolisis encontrados en la pared de la vena safena de pacientes con varices en la extremidad inferior.^{93,94}

En los segmentos de venas varicosas con engrosamiento intimal intenso estudiados en la presente Tesis, el patrón lesional de fibras elásticas se caracteriza por la presencia de fibras entrecortadas y por el depósito de material elástico amorfo. Estos cambios descritos son histológicamente bastante semejantes a los observados en procesos degenerativos de las fibras elásticas a medida que avanza la edad. En pacientes de mediana edad, en los que la

IVC es frecuente, y sobre todo en la senectud aparecen cambios de la organización de las fibras elásticas de múltiples órganos (piel, vasos sanguíneos, tejido elástico asociado al músculo visceral, etc.), provocándose una elastolisis progresiva, caracterizada ultraestructuralmente por una degeneración del centro claro de elastina, la cual puede contener depósito de material electrodensito muy irregular, y evidente disminución del manto periférico de fibrillas.¹⁷⁸ Estos cambios determinan el entrecortamiento de las fibras elásticas, las cuales están rotas, dicotomizadas y frecuentemente están sustituidas por un material elástico de aspecto granular.¹⁷⁸

Si bien está completamente demostrado que en los mecanismos de elastogénesis participan tanto los fibroblastos como las células musculares lisas, las cuales no sólo tienen la capacidad de sintetizar elastina, sino también moléculas de la matriz extracelular, incluidos el versicano.¹¹⁸ También en los mecanismos de elastolisis es posible que, en parte, participen procesos previos de atrofia y degeneración de las fibras musculares lisas, tal como se ha visto en el presente estudio en los casos de engrosamiento intimal moderado e intenso en los segmentos de pared venosa con lesión varicosa. Y esta especulación resulta verosímil si se tiene en cuenta que modelos experimentales de síndrome de Marfan han demostrado que la alteración de células musculares lisas son procesos que preceden al desarrollo de una elastolisis de la pared arterial; todos estos datos permiten sugerir que mecanismos parecidos también puedan ocurrir en la pared venosa de las lesiones iniciales intimales en pacientes con varices de la extremidad inferior.³⁵

La investigación de las fibras elásticas y de la interpretación de los mecanismos de elastogénesis en las lesiones iniciales y también en las bien establecidas de la íntima en venas varicosas ha sido uno de los resultados más significativos de la presente tesis.

Según nuestro estudio, a medida que aumenta la altura de la capa íntima la proporción de las fibras elásticas disminuye. En este engrosamiento intimal, las fibras elásticas están muy desorganizadas y no forman láminas circunferenciales, solo se ven pequeños discos de fibras de elastina y un material amorfo distribuido irregularmente por la matriz extracelular.

Con el fin de sistematizar si existe una organización peculiar de este material elástico en los diferentes grados de engrosamiento intimal, en el presente estudio hemos evaluado este problema mediante análisis fractal y multifractal, los cuales han sido aplicados en numerosos procesos biológicos y patológicos en los que los cambios histológicos tienen una distribución espacial muy irregular.^{65,96,101,164} El análisis de fractales ha sido realizado en alteraciones de vasos arteriales, aunque las publicaciones aún son escasas. En este sentido, se ha descrito mediante estudio de fractales que la estructura de la elastina en la capa media determina la función arterial y afecta a las propiedades mecánicas de la pared,¹⁶ o que la distribución de la orientación de las fibras de colágeno y fibras elásticas muestran una diferente respuesta ante el estrés mecánico.⁴⁸

Como decíamos previamente, el estudio mediante fractales ha sido utilizado en la evaluación de la pared arterial^{16,48,96,112} y de malformaciones arteriovenosas,¹⁹⁹ así como en la distribución de la microvasculatura,⁴⁵ pero en nuestro conocimiento nunca se han realizado análisis de fractales en venas normales y varicosas. Es relevante destacar que el estudio del análisis fractal permite valorar la estructura tridimensional de células y tejidos, ya que la descripción clásica basada en parámetros geométricos simples (por ejemplo: grosor de las láminas, distancia interlaminar, etc.) es insuficiente para describir estructuras complejas, mientras la estructura tridimensional puede ser cuantificada en parámetros basados en la textura, esto es, estudios de fractales y valoración de la dimensión fractal.¹⁶ La propiedad de autosimilitud, que es básica para el análisis fractal, se ha descrito tanto a nivel de estructura supramolecular, como a macroniveles en las fibras laminares e interlaminares formadas por fibras elásticas.¹⁴⁶ En definitiva, el análisis fractal puede ser usado en el estudio de la complejidad morfológica en los sistemas biológicos.¹⁹⁹

El objetivo de este trabajo es relacionar los cambios morfométricos del engrosamiento intimal con el análisis fractal en venas varicosas. En venas varicosas, el estudio fractal (Dc) realizado de las fibras elásticas orceína positivas del engrosamiento intimal otorga una Dc mayor en los casos con IVC que en el grupo de venas Control, lo que indica alteraciones en la capa íntima que se relacionan con una mayor desorganización de la estructura

tridimensional de las fibras elásticas. Estos datos se corroboran con las dimensiones fractales generalizadas D_0 , D_1 , D_2 .

También en el presente estudio se ha valorado el número fractal y dimensión en los diferentes estadios de engrosamiento intimal, desde un grupo Control con engrosamiento intimal mínimo o ausente, y tres grados de engrosamiento, dependiendo de la altura de la íntima. De este modo, la evaluación del espectro multifractal de las fibras elásticas teñidas con orceína demuestra que el punto máximo de las curvas de este espectro incrementa con la evolución de la patología venosa. La D_c en los sujetos Control fue similar al de una línea recta representada por la fibra elástica limitante interna. Asimismo, los distintos valores obtenidos para las dimensiones fractales generalizadas reflejan que los tejidos venosos de pacientes con IVC tiene una organización multifractal.

Hemos hecho fluorescencia para fractales. Sin duda el microscopio confocal demuestra importantes lesiones de las láminas elásticas de la pared arterial en situaciones de hipertensión y arterioesclerosis; sin embargo, los estudios de microscopía confocal han sido escasos. En la presente tesis se intentaron valorar las lesiones intimales, pero los resultados aún son preliminares, dada la irregularidad del depósito de material elástico en la íntima venosa.¹⁰

La compleja estructura que forman la elastina y el colágeno en la matriz extracelular forma la capa que soporta el resto de componentes de la pared arterial.⁴⁸ La distribución de la orientación de las fibras mostró cambios remarcables en la estructura de la matriz extracelular en respuesta a la carga mecánica.⁴⁸

La compleja estructura que forman el colágeno y la elastina en la matriz extracelular forma la principal red que soporta el resto de componentes de la pared arterial. El análisis cuantitativo de los cambios estructurales de la elastina y el colágeno se realizó usando una combinación de la Transformada bidimensional de Fourier y el análisis fractal.

En la presente tesis se ha demostrado que existen cambios inmunohistoquímicos y cuantitativos de la proporción de alfa actina de músculo liso, colágeno IV y fibras elásticas a medida que aumenta el engrosamiento de la íntima de la vena safena en pacientes con IVC.

Estos cambios se asocian también con un incremento de la elastogénesis de la íntima venosa, aunque la superficie ocupada por las fibras elásticas en relación a la superficie total de la íntima disminuye a medida que aumenta el engrosamiento intimal. Esta peculiar disfunción varicosa en los diferentes grados de engrosamiento intimal se correlacionan positivamente con modelos matemáticos de análisis multifractal. Todos estos datos sugieren que las lesiones de fibrosis intimal en las venas varicosas son irreversibles cuando progresa el engrosamiento intimal en pacientes con varices.

Nuestros resultados indican que es en las fases iniciales, cuando el engrosamiento es mínimo, el momento de explorar nuevos mecanismos o nuevas moléculas que eviten la progresión de la enfermedad. Hasta el momento presente no se han encontrado tratamientos médicos idóneos para prevenir la IVC y para impedir o remodelar los cambios iniciales intimales, aunque se están haciendo numerosos estudios para valorar la participación, entre otros, de mecanismo de estrés oxidativo e inflamación, con el fin de descubrir dianas terapéuticas que eviten el inicio de la lesión varicosa.

En relación con la fibrosis intimal de la arterioesclerosis, fundamentalmente en la formación de la placa de ateroma,¹⁹⁸ y en los cambios de la pared arterial secundarios a la hipertensión,²¹⁸ los mecanismos de remodelación de la fibrosis intimal han sido bien estudiados y en la actualidad se están desarrollando nuevos tratamientos farmacológicos. Está claro que en las venas estudiadas hemos demostrado cambios de la matriz extracelular de la íntima. En un estudio colaborativo desarrollado en el grupo de investigación sobre fisiología y patología vascular de la UAM (www.vasphysurg.com), hemos encontrado que moléculas como el LGF (proteína plasmática presente en sujetos normales) administrada en dosis fisiológicas o farmacológicas, en un modelo de hipertensión arterial, regulan los mecanismos de remodelación de la matriz extracelular y de fibrosis, provocando una mejoría de las lesiones histopatológicas arteriales.⁵³ Sin embargo, en la patología venosa humana y experimental aún no se han realizado estudios del efecto del LGF en mecanismos que mejorarían el engrosamiento intimal, abriendo nuevas perspectivas de líneas de investigación en el tratamiento de la IVC.

Las lesiones histopatológicas de engrosamiento intimal en el territorio de la vena safena son bastante semejantes a las lesiones de otros lugares anatómicos que provocan aumento del flujo sanguíneo e hipertensión intraluminal. En efecto, se han estudiado ampliamente las alteraciones morfológicas y funcionales del plexo pampiniforme en varones con varicocele, que se caracterizan en las fases iniciales por una insuficiencia valvular y una mínima fibrosis intimal, mientras que, en los casos de evidente varicocele clínico, el estudio histopatológico demuestra una atrofia de la capa muscular y una evidente fibrosis transmural e irreversible de la capa íntima y media de las venas espermáticas.¹⁹⁶

Dado que la enfermedad varicosa, independientemente del territorio venoso que se desarrolle, en los casos muy evolucionados se acompaña de una fibrosis de la pared vascular, sería sugestivo realizar investigaciones acerca de la proliferación y migración de las células madre adventiciales, en relación con los mecanismos de fibrosis y remodelación de pared venosa. De hecho, se sabe que las células madre relacionadas con los adipocitos periadventiciales de arterias participan en la formación de nuevos vasos sanguíneos, en la morfogénesis de la pared vascular,¹²³ y, por ello, también podrían participar en la remodelación de la pared arterial. Se abre pues una futura línea de investigación de la enfermedad varicosa centrada en el estudio de las células madre de la adventicia de las venas.

Así mismo, es necesario diseñar nuevas investigaciones de correlación de los cambios histopatológicos y de los mecanismos moleculares con estudios hemodinámicos y funcionales de las venas con diferentes grados de enfermedad varicosa; sin embargo, estas correlaciones morfofuncionales han sido ampliamente evaluadas en el territorio arterial. En este sentido, aunque en las arterias se ha estudiado el efecto que tienen las fuerzas biomecánicas producidas por las alteraciones hemodinámicas, aún son pocos los trabajos en venas, pero es sugestivo considerar que el fallo en la respuesta miogénica secundario a alteraciones hemodinámicas tiene un papel importante en el desarrollo de las venas varicosas.

El estudio histológico de la pared de venas completamente normales en material humano es complicado, dado que la obtención de muestras en pacientes sanos no es

éticamente posible. Lo que sí es posible, una vez obtenido el consentimiento informado para investigación, es estudiar segmentos de vena safena procedentes de pacientes sometidos a cirugía coronaria que no son utilizados en el by pass coronario.^{114,127} Estos segmentos podrían ser en el futuro una fuente de material del grupo Control para desarrollar nuevos estudios histológicos y moleculares relacionados con los mecanismos de formación de varices. Por último, como material control también podrían ser usados pequeños segmentos de vena aparentemente normal que sobran en la realización de fístulas arterio-venosas, como acceso vascular para los tratamientos de diálisis o aféresis, o de vena safena aparentemente normal no empleada en by-pass de extremidades o en revascularización coronaria.¹⁸⁴

La presente investigación sobre los mecanismos implicados en la fibrosis intimal relacionados con la enfermedad varicosa ha conllevado la participación de un equipo de investigación multidisciplinario, formado por cirujanos, patólogos y biólogos celulares y moleculares que permitirá abordar futuras investigaciones en patología vascular de la extremidad inferior. Son, pues, necesarios nuevos estudios histológicos, inmunohistoquímicos, morfológicos y moleculares con el fin de conocer los mecanismos íntimos de estenosis arteriales, de la formación de una neoíntima después de la aplicación de tratamientos endovasculares, así como de la formación y reparación de úlceras del pie diabético, que, como es bien conocido, representan una elevada co-morbilidad para el paciente y llevan aparejados altos recursos económicos, sociales y sanitarios.^{201,202}

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- PRIMERA.** La vena safena de pacientes con varices presenta un aumento progresivo de la túnica íntima.
- SEGUNDA.** A medida que aumenta el espesor de la íntima de la vena safena, existe un aumento progresivo de la expresión de actina de músculo liso y de colágeno tipo IV y también del depósito de las fibras elásticas en la íntima con lesiones varicosas.
- TERCERA.** En las fases menos evolucionadas de lesiones varicosas con menor incremento intimal, se observa una mayor proporción de la cantidad de alfa actina muscular que en las fases bien establecidas de engrosamiento intimal.
- CUARTA.** En fases precoces de la lesión varicosa intimal, es evidente la expresión de colágeno IV; sin embargo, al aumentar el engrosamiento intimal no se encuentra un incremento de la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de colágeno IV.
- QUINTA.** El progresivo incremento del engrosamiento de la íntima con lesiones varicosas se acompaña de un aumento del depósito de material elástico granular y de fibras elásticas finas y dicotomizadas, rodeadas por matriz extracelular amorfa.
- SEXTA.** El estudio fractal de los segmentos de venas safenas con lesiones intinales varicosas nos demuestra una progresiva desorganización y desestructuración de la túnica íntima, correlacionándose la dimensión fractal con el aumento de la altura de la túnica íntima y con la proporción de fibras elásticas.
- SÉPTIMA.** El estudio cuantitativo de las células musculares lisas y del depósito de colágeno IV y de fibras elásticas en la íntima de venas varicosas demuestra una importante variación de estas estructuras en los diferentes grados de engrosamiento intimal; además, una vez iniciado el proceso de alteración de la íntima, las lesiones de fibrosis son progresivas y permanentes.

RESUMEN

RESUMEN

En los pacientes con Insuficiencia Venosa crónica (IVC), las alteraciones clínicas y hemodinámicas son bien conocidas; así mismo, también se han descritos cambios histológicos en la pared de la vena safena varicosa, caracterizados por fibrosis y atrofia del músculo liso de la túnica media vascular. Se ha sugerido que alteraciones del endotelio vascular o mecanismos de estrés oxidativo e inflamatorios pudieran participar en los mecanismos moleculares del desarrollo de la enfermedad varicosa; sin embargo, los mecanismos íntimos implicados en la progresiva alteración de la capa íntima vascular no han sido establecidos.

En el presente estudio se cuantifican morfométricamente las fibras elásticas, y la expresión inmunohistoquímica de alfa actina de músculo liso y de colágeno IV en relación al progresivo engrosamiento íntimo que presenta la pared de vena safena en los segmentos con lesiones varicosas. También se comparan datos del análisis fractal de las fibras elásticas, con los valores histométricos de estas fibras localizadas en la túnica íntima.

Se han evaluado el segmento proximal y el segmento distal de a vena safena extirpada en 20 pacientes con IVC. En todas las muestras histológicas se ha cuantificado la expresión inmunohistoquímica de alfa actina muscular y de colágeno IV, así como la disposición de las fibras elásticas teñidas con orceína. Se ha obtenido el área ocupada por estas estructuras en relación al área total de la íntima, usando el programa ImageJ. También se ha calculado el número fractal y la dimensión fractal de las fibras elásticas íntimas en los diferentes grados de engrosamiento íntimo, con el fin de determinar si existe un patrón de organización tridimensional de las fibras elásticas y de la matriz extracelular en la íntima de venas varicosas.

Nuestros resultados han demostrado que la vena safena de pacientes con varices presenta un aumento progresivo de la túnica íntima, debido a un incremento de la expresión de actina de músculo liso y de colágeno tipo IV, y también al depósito de la material elástico y de fibras elásticas cortas e incompletas, aunque la superficie relativa ocupada por las fibras elásticas en relación a la superficie total de la íntima disminuye en los casos con importante

engrosamiento intimal. En las fases menos evolucionadas de lesiones varicosas, cuando el incremento intimal es mínimo, se observa una mayor proporción de la cantidad de alfa actina muscular que en las fases bien establecidas de engrosamiento intimal; además, al aumentar el engrosamiento intimal, no se observa un incremento correspondiente de la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de colágeno IV. El análisis fractal de los segmentos de venas safenas con lesiones intimaes varicosas nos demuestra una progresiva desorganización y desestructuración de la túnica íntima, correlacionándose la dimensión fractal con el aumento de la altura de la túnica íntima y con la proporción de fibras elásticas.

En definitiva, todos estos datos sugieren que las lesiones de fibrosis intimal aumentan paralelamente al incremento del engrosamiento intimal y una vez iniciado el proceso de alteración de la íntima, las lesiones de fibrosis son progresivas y permanentes. Nuestros resultados indican que en las fases iniciales, cuando el engrosamiento intimal es mínimo, es el momento de explorar nuevos mecanismos o nuevas moléculas que eviten la progresión de la enfermedad. Hasta el momento presente no se han encontrado tratamientos médicos idóneos para prevenir la IVC y para impedir o remodelar los cambios iniciales intimaes, aunque se están haciendo numerosos estudios para valorar las participación, entre otros, de mecanismos de estrés oxidativo e inflamatorios, muy probablemente desencadenados por las fuerzas biomecánicas secundarias a las alteraciones hemodinámicas, con el fin de descubrir dianas terapéuticas que eviten la progresión de la lesión varicosa.

SUMMARY

SUMMARY

Clinical and hemodynamic alterations are well established in patients with Chronic Venous Insufficiency (CVI), and histological changes have been demonstrated at saphenous vein wall. These lesions are characterized by fibrosis and smooth muscle cell atrophy. In relation to molecular mechanism of varicose disease, it has been suggest that endothelial alteration can be secondary to inflammatory or oxidative stress mechanism. However, the intimal mechanism implicated to progressive intimal thickness has not been well knowledge.

In the present study, the morphometrical quantification of both elastic fibers distribution and immunochemical stain of the smooth muscle actin and collagen IV in relation to intimal progressive thickness of the saphenous intimal layer with the varicose lesions were performed. Additionally, fractal analysis of elastic fibers were done and compared to histometric data from intimal vein wall.

Proximal and distal segments of saphenous vein from 20 CVI patients were evaluated. Immuhistochemical expression of alpha smooth muscle actin and collagen IV, as well as orcein stain for elastic fibers were histometrically quantified. The area of these structures in relation to intimal surface was obtained by ImageJ software. Fractal number and fractal dimension of intimal elastic fibers patterns observed at distinct intimal thickness grades were also evaluated. Tridimensional organization of the elastic fiber into the extracellular matrix was explored by fractal analysis methods.

Our data demonstrated a progressive thickness of the intimal saphenous vein, due to increased expression of smooth muscle actin and collagen IV, as well as, short or incomplete elastic fiber and elastic amorphous material deposition were shown. Although, the ratio of elastic fibers to total intimal area decrease along the length of the intimal thickness. In initial varicose lesions with minimal intimal thickness, we observed higher smooth muscle actin ratio than at well established lesions with a great intimal thickness. Contrarily, not collagen IV increase was observed. Fractal analysis of the intimal vein layer showed a progressive disorganization of the intimal wall rise according to intimal growing. Moreover, a statistical positive correlation of fractal data to histometric determinations of elastic fibers was found.

In conclusion, this data suggest that intimal fibrosis rise according to intimal thickness. Development of intimal lesion of varicose vein determined a permanent fibrosis. Therefore, the initial phase of the intimal thickness can be the appropriate moment to explored new molecules and mechanism to prevent the progression of varicose disease. Nowadays, adequate pharmacological treatment to prevent CVI were not suitable, moreover the drugs discovery research that modified fibrosis at initial phases in intimal lesions in varicose vein has also not been full satisfactory. In actuality, new research in oxidative stress or inflammation mechanisms for initial varicose disease has been developed. Probably, hemodynamic alterations seen in CVI patients could be caused by initial oxidative stress and inflammation process, that determinate the initial intimal fibrosis of varicose vein.

REFERENCIAS

1. **Abramson JH, Hopp C, Epstein LM.** The epidemiology of varicose veins. A survey in western Jerusalem. *J Epidemiol Community Health* 1981;35:213-217.
2. **Adams J, Schott S, Bern A, Renz M, Ikenberg K, Garbe C, Busch C.** A novel role for relaxin-2 in the pathogenesis of primary varicosis. *PLoS ONE* 2012;7:e39021.
3. **Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR Jr.** Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;38:584-588.
4. **Aitken RJ, Matley PJ, Immelman EJ.** Lower limb vein trauma: a long-term clinical and physiological assessment. *Br J Surg* 1989;76:585-588.
5. **Al-Benna S, Hamilton CA, McClure JD, Rogers PN, Berg GA, Ford I, Delles C, Dominiczak AF.** Low-density lipoprotein cholesterol determines oxidative stress and endothelial dysfunction in saphenous veins from patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:218-223.
6. **Aller MA, De las Heras N, Nava MP, Regadera J, Arias J, Lahera V.** Splanchnic-aortic inflammatory axis in experimental portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2013;19:7992-7999.
7. **Andersson E, Hansson C, Swanbeck G.** Leg and foot ulcer prevalence and investigation of the peripheral arterial and venous circulation in a randomised elderly population. An epidemiological survey and clinical investigation. *Acta Derm Venereol* 1993;73:57-61.
8. **Anwar MA, Shalhoub J, Lim CS, Gohel MS, Davies AH.** The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *J Vasc Res* 2012;49:463-478.
9. **Arribas SM, Briones AM, Bellingham C, González MC, Salaices M, Liu K, Wang Y, Hinek A.** Heightened aberrant deposition of hard-wearing elastin in conduit arteries of prehypertensive SHR is associated with increased stiffness and inward remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H2299-H2307.
10. **Arribas SM, Daly CJ, González MC, McGrath JC.** Imaging the vascular wall using confocal microscopy. *J Physiol* 2007;584:5-9.
11. **Arribas SM, Hermida C, González MC, Wang Y, Hinek A.** Enhanced survival of vascular smooth muscle cells accounts for heightened elastin deposition in arteries of neonatal spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol* 2010;95:550-560.
12. **Arribas SM, Hinek A, M. González MC.** Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006;111:771-791.
13. **Asbeutah AM, Asfar SK, Safar H, Oriowo MA, Elhagrassi I, Abu-Assi MA, Cameron JD, McGrath BP.** In vivo and in vitro assessment of human saphenous vein wall changes. *Open Cardiovasc Med J* 2007;1:15-21.
14. **Asciutto G, Mumme A, Asciutto KC, Geier B.** Oestradiol levels in varicose vein blood of patients with and without pelvic vein incompetence (PVI): diagnostic implications. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40:117-121.
15. **Aunapuu M, Arend A.** Histopathological changes and expression of adhesion molecules and laminin in varicose veins. *Vasa* 2005;34:170-175.
16. **Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M.** Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension* 1998;32:170-175.

17. Baker SR, Stacey MC, Jopp-McKay AG, Hoskin SE, Thompson PJ. Epidemiology of chronic venous ulcers. *Br J Surg* 1991;78:864-867.
18. Baker SR, Stacey MC, Singh G, Hoskin SE, Thompson PJ. Aetiology of chronic leg ulcers. *Eur J Vasc Surg* 1992;6:245-51.
19. Basu P, Qipshidze N, Sen U, Givvimani S, Munjal C, Mishra PK, Tyagi SC. Chronic hyperhomocysteinemia causes vascular remodelling by instigating vein phenotype in artery. *Arch Physiol Biochem* 2011;117:270-282.
20. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol* 2005;15:175-84.
21. Belcaro G, Grigg M, Rulo A, Nicolaides A. Blood flow in the perimalleolar skin in relation to posture in patients with venous hypertension. *Ann Vasc Surg* 1989;3:5-7.
22. Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW, Smith PD, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Chronic venous disease. *N Engl J Med* 2006;355:488-498.
23. Bernal LR, Portero JL, Vila M, Ruiz DF, Reparaz LM. Hemoptysis caused by a left subclavian pseudoaneurysm: endovascular solution for a challenging case. *Vascular* 2011. PMID: 22075628.
24. Bogusiewicz M, Semczuk A, Juszcak M, Langner E, Walczak K, Rzeski W, Tomaszewski J, Rechberger T. Expression of matricellular proteins in human uterine leiomyomas and normal myometrium. *Histol Histopathol* 2012;27:1495-1502.
25. Boisseau MR, Roudaut MF, Seigneur M, et al. Relationship between age, fibrinogen and clinical status in 313 patients with CVI. *Biorheology* 1995;32:279.
26. Bollinger A, Fagrell B. Clinical Capillaroscopy: A Guide to Its Use in Clinical Research and Practice. Hogrefe & Huber Publishers; Bern, Switzerland, 1990.
27. Bollinger A, Isenring G, Franzeck UK. Lymphatic microangiopathy: a complication of severe chronic venous incompetence(CVI). *Lymphology* 1982;15:60-65.
28. Bollinger A, Jäger K, Sgier F, Seglias J. Fluorescence microlymphography. *Circulation* 1981;64:1195-200.
29. Bollinger A, Leu AJ. Evidence for microvascular thrombosis obtained by intravital fluorescence videomicroscopy. *Vasa* 1991;3:252-255.
30. Bollinger A, Leu AJ, Hoffmann U, Franzeck UK. Microvascular changes in venous disease: an update. *Angiology* 1997;48:27-32.
31. Brand FN, Dannenberg AL, Abbott RD, Kannel WB. The epidemiology of varicose veins: the Framingham Study. *Am J Prev Med* 1988;4:96-101.
32. Brandjes DPM, Büler H, Hejboer H, et al. Randomised trial of effect of compression stockings in patients with symptomatic proximal-vein thrombosis. *Lancet* 1997;349:759-762.
33. Braverman B, Tambasco M. Scale-specific multifractal medical image analysis. *Comput Math Methods Med* 2013;262931:19.
34. Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet* 1982;2:243-245.
35. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res* 2001;88:37-43.

36. Brunner F, Hoffmann C, Schuller-Petrovic S. Responsiveness of human varicose saphenous veins to vasoactive agents. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:219-224.
37. Buján J, Jiménez-Cossio JA, Jurado F, Gimeno MJ, Pascual G, García-Honduvilla N, Dominguez B, Bellón JM. Evaluation of the smooth muscle cell component and apoptosis in the varicose vein wall. *Histol Histopathol* 2000;15:745-752.
38. Burnand KG, Whimster I, Naidoo A, Browse NL. Pericapillary fibrin in the ulcer-bearing skin of the leg: the cause of lipodermatosclerosis and venous ulceration. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285:1071-1072.
39. Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. *Br J Surg* 1994;81:167-173.
40. Callam MJ, Harper DR, Dale JJ, Ruckley CV. Chronic ulcer of the leg: clinical history. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294:1389-1391.
41. Capeheart JK. Chronic venous insufficiency: a focus on prevention of venous ulceration. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 1996;23:227-234.
42. Carrasco OF, Ranero A, Hong E, Vidrio H. Endothelial function impairment in chronic venous insufficiency: effect of some cardiovascular protectant agents. *Angiology* 2010;60:763-771.
43. Chamorro-Jorganes A, Calleros L, Griera M, Saura M, Luengo A, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Fibronectin upregulates cGMP-dependent protein kinase type I through C/EBP transcription factor activation in contractile cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300:C683-C691.
44. Chang JW, Maeng YH, Kim SW. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in varicose veins. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 44: 387-391.
45. Charalampidis D, Pascotto M, Kerut EK, Lindner JR. Anatomy and flow in normal and ischemic microvasculature based on a novel temporal fractal dimension analysis algorithm using contrast enhanced ultrasound. *IEEE Trans Med Imaging* 2006;25:1079-1086.
46. Charles AK, Gresham GA. Histopathological changes in venous grafts and in varicose and non-varicose veins. *J Clin Pathol* 1993;46:603-606.
47. Chhabra A, Jensen RV. Direct determination of the $f(\alpha)$ singularity spectrum. *Phys Rev Lett* 1989;62:1327-1330.
48. Chow MJ, Turcotte R, Lin CP, Zhang Y. Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen. *Biophys J* 2014;106:2684-2692.
49. Christopoulos DG, Nicolaidis AN, Szendro G, Irvine AT, Bull ML, Eastcott HH. Air-plethysmography and the effect of elastic compression on venous hemodynamics of the leg. *J Vasc Surg* 1987;5:148-159.
50. Clarke GH, Vasdekis SN, Hobbs JT, Nicolaidis AN. Venous wall function in the pathogenesis of varicose veins. *Surgery* 1992;111:402-408.
51. Clifford PS, Ella SR, Stupica AJ, Nourian Z, Li M, Martinez-Lemus LA, Dora KA, Yang Y, Davis MJ, Pohl U, Meininger GA, Hill MA. Spatial distribution and mechanical function of elastin in resistance arteries: a role in bearing longitudinal stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2889-2896.
52. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:1726-1727.

53. Conde MV, Gonzalez MC, Briones AM, Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Regadera J, Susin C, Diaz-Gil JJ, Arribas SM. Liver growth factor treatment restores cell-extracellular matrix balance in resistance arteries and improves left ventricular hypertrophy in SHR. *Am J Physiol Heartt Circ Physiol* 2011;301:H1153-1165.
54. Condezo-Hoyos L, Rubio M, Arribas SM, España-Caparrós G, Rodríguez-Rodríguez P, Mujica-Pacheco E, González MC. A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg* 2013;57:205-213.
55. Coon MM, Willis PW, Keller JB. Venous thromboembolism and other venous disease in the Tecumseh Community Health Study. *Circulation* 1973;48:839-846.
56. Cooper DG, Hillman-Cooper CS, Barker SG, Hollingsworth SJ. Primary varicose veins: the sapheno-femoral junction, distribution of varicosities and patterns of incompetence. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;25:53-59.
57. Corcos L, De Anna D, Dini M, Macchi C, Ferrari PA, Dini S. Proximal long saphenous vein valves in primary venous insufficiency. *J Mal Vasc*. 2000; 25: 27-36.
58. Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De Vincenzi I, Carpentier PH. Importance of the familial factor in varicose disease. Clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol* 1994;20:318-326.
59. Cornwall JV, Doré CJ, Lewis JD. Leg ulcers: epidemiology and aetiology. *Br J Surg* 1986;73:693-696.
60. Dajani OM, Haddad FF, Hajj HA, Sfeir RE, Khoury GS. Injury to the femoral vessels--the Lebanese War experience. *Eur J Vasc Surg* 1988;2:293-296.
61. Da Silva A, Navarro MF, Batalheiro J. The importance of chronic venous insufficiency. Various preliminary data on its medico-social consequences. *Phlebologie* 1992;45:439-443.
62. De Backer G. Epidemiology of chronic venous insufficiency. *Angiology* 1997;48:569-576.
63. De las Heras N, Aller MA, Martin Fernandez B, Miana M, Ballesteros S, Regadera J, Cachoferiro V, Arias J, Lahera V. A wound-like inflammatory aortic response in chronic portal hypertensive rats. *Mol Immunol* 2012;51:177-187.
64. Delis KT, Husmann M, Kalodiki E, Wolfe JH, Nicolaidis AN. In situ hemodynamics of perforating veins in chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg* 2001;33:773-782.
65. Dey P. Basic principles and applications of fractal geometry in pathology: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:284-290.
66. Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI. Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J* 2000;14:1775-1783.
67. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic venous insufficiency. *Circulation* 2005;111:2398-2409.
68. Edwards JE, Edwards EA. The saphenous valves in varicose veins. *Am Heart J* 1940;19:338.
69. Elsharawy MA, Naim MM, Abdelmaguid EM, Al-Mulhim AA. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6:219-224.
70. Esmon CT, Esmon NL. The link between vascular features and thrombosis. *Annu Rev Physiol* 2011;73:503-514.

71. España G, Regadera J, Sánchez-Coll S, Rodríguez-González JI, Sáez JL, Hernández A, Alamo O, Magallón P, Jiménez-Cossío J. Desarrollo del sector fémoro-poplíteo en fetos humanos. *Angiologia* 1986;38:171-177.
72. España G, Sánchez-Coll S, Regadera J, Redondo E, Rodríguez JI, Jiménez-Cossío JA. Desarrollo de las arterias de la pie y pie en fetos humanos: estudio angiográfico. *Angiologia* 1987;39:178-185.
73. Evans CJ, Fowkes FG, Ruckley CV, Lee AJ. Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health* 1999;53:149-153.
74. Fagrell B. Microcirculatory disturbances - the final cause for venous leg ulcers? *Vasa* 1982; 11:101-103.
75. Falanga V, Kruskal J, Franks JJ. Fibrin- and fibrinogen-related antigens in patients with venous disease and venous ulceration. *Arch Dermatol* 1991;127:75-78.
76. Fan CM. Venous pathophysiology. *Semin Intervent Radiol* 2005;22:157-161.
77. Feldner A, Otto H, Rewerk S, Hecker M, Korff T. Experimental hypertension triggers varicosis-like maladaptive venous remodeling through activator protein-1. *FASEB J* 2011;25:3613-3621.
78. Ferri F, Greco M, Arcòvito G, De Spirito M, Rocco M. Structure of fibrin gels studied by elastic light scattering techniques: dependence of fractal dimension, gel crossover length, fiber diameter, and fiber density on monomer concentration. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2002;66:011913.
79. Fiebig A, Krusche P, Wolf A, Krawczak M, Timm B, Nikolaus S, Frings N, Schreiber S. Heritability of chronic venous disease. *Hum Genet* 2010;127:669-674.
80. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Sympathetic purinergic vasoconstriction and thermosensitivity in a canine cutaneous vein. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;239:784-789.
81. Fowkes FG, Evans CJ, Lee AJ. Prevalence and risk factors of chronic venous insufficiency. *Angiology* 2001;52:S5-15.
82. Fowkes FGR, Lee AJ, Evans CJ, et al. Lifestyle risk factors for lower limb venous reflux in the general population: Edinburgh vein study. *Int J Epidemiol* 2001;30:846-852.
83. Franks PJ, Wright DD, Moffatt CJ, Stirling J, Fletcher AE, Bulpitt CJ, McCollum CN. Prevalence of venous disease: a community study in west London. *Eur J Surg* 1992;158:143-147.
84. Franzeck UK, Bollinger A, Huch R, Huch A. Transcutaneous oxygen tension and capillary morphologic characteristics and density in patients with chronic venous incompetence. *Circulation* 1984;70:806-811.
85. Franzeck UK, Haselbach P, Speiser D, Bollinger A. Microangiopathy of cutaneous blood and lymphatic capillaries in chronic venous insufficiency (CVI). *Yale J Biol Med* 1993;66:37-46.
86. Franzeck UK, Schach I, Jager KA, et al. Prospective 12-year follow-up study of clinical and hemodynamic sequelae after deep vein thrombosis in low-risk patients (Zurich Study). *Circulation* 1996;93:74-79.
87. Frings N, Nelle A, Tran P, Fischer R, Krug W. Reduction of neoreflux after correctly performed ligation of the saphenofemoral junction. A randomized trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 246-252.

88. **Gandhi RH, Irizarry E, Nackman GB, Halpern VJ, Mulcare RJ, Tilson MD.** Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg* 1993; 18:814-820.
89. **Glass GM.** Neovascularization in recurrence of varices of the great saphenous vein in the groin: phlebography. *Angiology* 1988;39:577-582.
90. **Gohel MS, Windhaber RA, Tarlton JF, Whyman MR, Poskitt KR.** The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. *J Vasc Surg* 2008;48:1272-1277.
91. **Goldman MP, Fronck A.** Anatomy and pathophysiology of varicose veins. *J Dermatol Surg Oncol* 1989;15:138-145.
92. **Golledge J, Quigley FG.** Pathogenesis of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;25:319-324.
93. **González JM, Briones AM, Somoza B, Daly CJ, Vila E, Starcher B, McGrath JC, M. González MC, Arribas SM.** Postnatal alterations in elastic fiber organization precede resistance artery narrowing in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H804-H812.
94. **González JM, Briones AM, Starcher B, Conde MV, Somoza B, Daly C, Vila E, McGrath I, González MC, Arribas SM.** Influence of elastin on rat small artery mechanical properties. *Exp Physiol* 2005;90:463-468.
95. **Gould DJ, Reece GP.** Skin graft vascular maturation and remodeling: a multifractal approach to morphological quantification. *Microcirculation* 2012;19:652-663.
96. **Gould DJ, Vadakkan TJ, Poche RA, Dickinson ME.** Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. *Microcirculation* 2011;18:136-151.
97. **Gupta A, McCarthy S.** Pelvic varices as a cause for pelvic pain: MRI appearance. *Magn Reson Imaging* 1994; 12: 679-681.
98. **Guzik B, Chwała M, Matusik P, Ludew D, Skiba D, Wilk G, Mrowiecki W, Batko B, Cencora A, Kapelak B, Sadowski J, Korbut R, Guzik TJ.** Mechanisms of increased vascular superoxide production in human varicose veins. *Pol Arch Med Wewn* 2011;121:279-286.
99. **Hansson C, Andersson E, Swanbeck G.** A follow-up study of leg and foot ulcer patients. *Acta Derm Venereol* 1987;67:496-500.
100. **Harsha A, Stojadinovic O, Brem H, Sehara-Fujisawa A, Wewer U, Loomis CA, Blobel CP, Tomic-Canic M.** ADAM12: a potential target for the treatment of chronic wounds. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:961-969.
101. **Helmberger M, Pienn M, Urschler M, Kullnig P, Stollberger R, Kovacs G, et al.** Quantification of tortuosity and fractal dimension of the lung vessels in pulmonary hypertension patients. *PLoS One* 2014;9:e87515
102. **Hermoso Cuenca V, Minguela Cantalejo F, Magallón Ortín P, Hernández Díaz A, Sáez Martín L, Sánchez Coll S, Alamo Salazar O, España Caparrós G, Jiménez Cossío JA.** Estudio Socioeconómico de la enfermedad venosa. *Angiología* 1988;40:203-205.
103. **Hiroi Y, Guo Z, Li Y, Beggs AH, Liao JK.** Dynamic regulation of endothelial NOS mediated by competitive interaction with α -actinin-4 and calmodulin. *FASEB J* 2008;22:1450-1457.
104. **Hume M.** A venous renaissance? *J Vasc Surg* 1992;15:947-951.

105. Hume M. Venous ulcers, the vascular surgeon, and the Medicare budget. *J Vasc Surg* 1992;16: 671-673.
106. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001;38:581-587.
107. Jacob T, Hingorani A, Ascher E. Overexpression of transforming growth factor-beta1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg* 2005;41:523-530.
108. Jäger K, Seifert H, Bollinger A. M-mode echovenography: a new technique for the evaluation of venous wall and valve motion. *Cardiovasc Res* 1989;23:25-30.
109. Jantet G. The socioeconomic impact of venous pathology in Great Britain. *Phlebologie* 1992; 45:433-457.
110. Jeanneret C, Labs KH, Aschwanden M, Bollinger A, Hoffmann U, Jäger K. Physiological reflux and venous diameter change in the proximal lower limb veins during a standardised Valsalva manoeuvre. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17:398-403.
111. Jeanneret C, Jäger KA, Zaugg CE, Hoffmann U. Venous reflux and venous distensibility in varicose and healthy veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;34:236e242.
112. Jiang CF, Avolio AP. Characterisation of structural changes in the arterial elastic matrix by a new fractal feature: directional fractal curve. *Med Biol Eng Comput* 1997;35:246-252.
113. Johnson BF, Manzo RA, Bergelin RO, Strandness DE Jr. Relationship between changes in the deep venous system and the development of the postthrombotic syndrome after an acute episode of lower limb deep vein thrombosis: a one- to six-year follow-up. *J Vasc Surg* 1995;21: 307-312.
114. Jones RH, Velazquez EJ, Michler RE, Sopko G, Oh JK, O'Connor CM, Hill JA, Menicanti L, Sadowski Z, Desvigne-Nickens P, Rouleau JL, Lee KL. Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction. *N Engl J Med* 2009;360:1705-1717.
115. Jung SC, Lee W, Chung JW, Jae HJ, Park EA, Jin KN, Shin CI, Park JH. Unusual causes of varicose veins in the lower extremities: CT venographic and doppler US findings. *Radiographics* 2009; 29: 525-536.
116. Kanwar A, Hansrani M, Lees T, Stansby G. Trends in varicose vein therapy in England: radical changes in the last decade. *Ann R Coll Surg Engl* 2010;92:341-346.
117. Keeley FW, Alatawi A. Response of aortic elastin synthesis and accumulation to developing hypertension and the inhibitory effect of colchicine on this response. *Lab Invest* 1991;64:499-507.
118. Keire PA, L'Heureux N, Vernon RB, Merrilees MJ, Starcher B, Okon E, Dusserre N, McAllister TN, Wight TN. Expression of versican isoform V3 in the absence of ascorbate improves elastogenesis in engineered vascular constructs. *Tissue Eng Part A* 2010;16:501-512.
119. Kendler M, Makrantonaki E, Tzellos T, Kratzsch J, Anderegg U, Wetzig T, Zouboulis C, Simon JC. Elevated sex steroid hormones in great saphenous veins in men. *J Vas Surg* 2010;51:639-646.
120. Killewich LA, Bedford GR, Beach KW, Strandness DE Jr. Spontaneous lysis of deep venous thrombi: rate and outcome. *J Vasc Surg* 1989;9:89-97.

121. Killewich LA, Martin R, Cramer M, Beach KW, Strandness DE Jr. An objective assessment of the physiologic changes in the postthrombotic syndrome. *Arch Surg* 1985;120:424-426.
122. Kistner RL, Eklof B, Masuda EM. Diagnosis of chronic venous disease of the lower extremities: the "CEAP" classification. *Mayo Clin Proc* 1996;71:338-345.
123. Klein D, Hohn HP, Kleff V, Tilki D, Ergün S. Vascular wall-resident stem cells. *Histol Histopathol* 2010; 25: 681-689.
124. Kirsch D, Schreiber J, Dienes HP, Böttger T, Junginger T. Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *Vasa* 1999;28:95-99.
125. Klonizakis M, Yeung JM, Lingam K, Nash JR, Manning G, Donnelly R. Contrasting effects of varicose vein surgery on endothelial-dependent and -independent cutaneous vasodilation in the perimalleolar region. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31:434-438.
126. Kockx MM, Knaapen MW, Bortier HE, Cromheeke KM, Bouterin-Falson O, Finet M. Vascular remodeling in varicose veins. *Angiology* 1998;49:871-877.
127. König G, McAllister TN, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C, Marini A, Fiorillo A, Avila H, Wystrychowski W, Zagalski K, Maruszewski M, Jones AL, Cierpka L, de la Fuente LM, L'Heureux N. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials* 2009;30:1542-1550.
128. Kostas TI, Ioannou CV, Drygiannakis I, Georgakarakos E, Kounos C, Tsetis D, Katsamouris AN. Chronic venous disease progression and modification of predisposing factors. *J Vas Surg* 2010; 51:900-907.
129. Krzyściak W, Kózka M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. *Acta Biochim Pol* 2011;58:89-94.
130. Kurz X, Kahn SR, Abenhaim L, Clement D, Norgren L, Baccaglini U, Berard A, Cooke JP, Cornu-Thenard A, Depairon M, Dormandy JA, Durand-Zaleski I, Fowkes GR, Lamping DL, Partsch H, Scurr JH, Zuccarelli F. Chronic venous disorders of the leg: epidemiology, outcomes, diagnosis and management. Summary of an evidence-based report of the VEINES task force. Venous Insufficiency Epidemiologic and Economic Studies. *Int Angiol* 1999;18:83-102.
131. Labropoulos N, Mansour MA, Kang SS, Gloviczki P, Baker WH. New insights into perforator vein incompetence. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;18:228-234.
132. Labropoulos N, Patel PJ, Tiongson JE, Pryor L, Leon LR Jr, Tassiopoulos AK. Patterns of venous reflux and obstruction in patients with skin damage due to chronic venous disease. *Vasc Endovascular Surg* 2007;41:33-40.
133. Laflamme K, Roberge CJ, Grenier G, Rémy-Zolghadri M, Pouliot S, Baker K, Labbé R, D'Orléans-Juste P, Auger FA, Germain L. Adventitia contribution in vascular tone: insights from adventitia-derived cells in a tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 2006;20:1245-1247.
134. Lafuma A, Fagnani F, Peltier-Pujol F, Rauss A. Venous disease in France: an unrecognized public health problem. *J Mal Vasc* 1994;19:185-189.
135. Langille BL, Brownlee RD, Adamson SL. Perinatal aortic growth in lambs: relation to blood flow changes at birth. *Am J Physiol* 1990;259:H1247-1253.

136. Lapidus L, Bengtsson C, Hällström T, Björntorp P. Obesity, adipose tissue distribution and health in women--results from a population study in Gothenburg, Sweden. *Appetite* 1989;13:25-35.
137. Laurikka JO, Sisto T, Tarkka MR, Auvinen O, Hakama M. Risk indicators for varicose veins in forty- to sixty-year-olds in the Tampere varicose vein study. *World J Surg* 2002;26:648-651.
138. Le Devehat C, Boisseau MR, Vimeux M, et al. Hemorheological factors in the pathophysiology of venous disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 1989;9:861-870.
139. Lees TA, Lambert D. Prevalence of lower limb ulceration in an urban health district. *Br J Surg* 1992;79:1032-1034.
140. Lemarié CA, Tharaux PL, Lehoux S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:433-439.
141. Levy BI, Michel JB, Salzmann JL, Azizi M, Poitevin P, Safar M, Camilleri JP. Effects of chronic inhibition of converting enzyme on mechanical and structural properties of arteries in rat renovascular hypertension. *Circ Res* 1988;63:227-239.
142. Lindner DJ, Edwards JM, Phinney ES, Taylor LM Jr, Porter JM. Long-term hemodynamic and clinical sequelae of lower extremity deep vein thrombosis. *J Vasc Surg* 1986;4:436-442.
143. Lippi G, Franchini M. Pathogenesis of venous thromboembolism: when the cup runneth over. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:747-761.
144. Lindhagen A, Bergqvist D, Hallböök T, Berndtsson L. Venous function after fracture of the lower extremity. A 9-year follow-up of 150 cases. *Acta Orthop Scand* 1985;56:110-114.
145. Lindholm C, Bjellerup M, Christensen OB, Zederfeldt B. A demographic survey of leg and foot ulcer patients in a defined population. *Acta Derm Venereol* 1992;72:227-230.
146. Lopes R, Betrouni N. Fractal and multifractal analysis: a review. *Med Image Anal* 2009;13:634-649.
147. Lowell RC, Gloviczki P, Miller VM. In vitro evaluation of endothelial and smooth muscle function of primary varicose veins. *J Vasc Surg* 1992;16:679-686.
148. Lozano Sánchez FS, González-Porras JR, Díaz Sánchez S, Marinel Lo Roura J, Sánchez Nevarez I, Carrasco EC, Escudero Rodríguez JR; C-VIVES Study investigators. Negative impact of deep venous thrombosis on chronic venous disease. *Thromb Res* 2013;131:e123-126.
149. Ludbrook J, Beale G. Femoral venous valves in relation to varicose veins. *Lancet* 1962;1:79-81.
150. Ludbrook J. Valvular defect in primary varicose veins: cause or effect? *Lancet* 1963;2:1289-1292.
151. Majesky MW, Dong XR, Regan JN, Hoglund VJ. Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res* 2011;108:365-377.
152. Markel A, Manzo RA, Bergelin RO, Strandness DE Jr. Valvular reflux after deep vein thrombosis: incidence and time of occurrence. *J Vasc Surg* 1992;15:377-384.
153. Martin-Cordova CG, Regadera J, Hernandez A, Cobo P, Nistal M. Immunocytochemical methods in cellular cultures. Evaluation of cellular cycle and differentiation in normal and neoplastic tissue. *J. Histotechnol* 1996;19:109-114.

154. Masuda EM, Kistner RL, Eklof B. Prospective study of duplex scanning for venous reflux: comparison of Valsalva and pneumatic cuff techniques in the reverse Trendelenburg and standing positions. *J Vasc Surg* 1994;20:711-720.
155. Mayberry JC, Moneta GL, DeFrang RD, Porter JM. The influence of elastic compression stockings on deep venous hemodynamics. *Vasc Surg* 1991;13:91-100.
156. Meissner MH, Eklof B, Smith PC, Dalsing MC, DePalma RG, Gloviczki P, Moneta G, Neglén P, O' Donnell T, Partsch H, Raju S. Secondary chronic venous disorders. *J Vasc Surg* 2007;46:68S-83S.
157. Meissner MH, Gloviczki P, Bergan J, Kistner RL, Morrison N, Pannier F, Pappas PJ, Rabe E, Raju S, Villavicencio JL. Primary chronic venous disorders. *J Vasc Surg* 2007;46:54S-67S.
158. Meissner MH, Moneta G, Burnand K, Gloviczki P, Lohr JM, Lurie F, Mattos MA, McLafferty RB, Mozes G, Rutherford RB, Padberg F, Sumner DS. The hemodynamics and diagnosis of venous disease. *J Vasc Surg* 2007;46:4S-24S.
159. Meissner MH, Natiello C, Nicholls SC. Performance characteristics of the venous clinical severity score. *J Vasc Surg* 2002;36:889-895.
160. Mercy Cleetus HM, Singh D. Multifractal application on electrocardiogram. *J Med Eng Technol* 2014;38:55-61.
161. Min SK, Kim SY, Park YJ, Lee W, Jung IM, Lee T, Ha J, Kim SJ. Role of three-dimensional computed tomography venography as a powerful navigator for varicose vein surgery. *J Vas Surg* 2010;51:893- 899.
162. Mironiuc A, Palcău L, Rogojan L, Micula S, Gherman C. Is there a correlation between the CEAP score and the histopathological findings in varicose disease? *Rom J Morphol Embryol* 2011;52:117-121.
163. Moore K, Huddleston E, Stacey MC, Harding KG. Venous leg ulcers - the search for a prognostic indicator. *Int Wound J* 2007;4:163-172.
164. Moore B, Prasad Dasi L. Quantifying left ventricular trabeculae function - application of image-based fractal analysis. *Physiol Rep* 2013;1:10.
165. Morano JU, Raju S. Chronic venous insufficiency: assessment with descending venography. *Radiology* 1990;174:441-444.
166. Mühlberger D, Morandini L, Brenner E. Venous valves and major superficial tributary veins near the saphenofemoral junction. *J Vas Surg* 2009;49:1562-1569.
167. Nelson O, Bergqvist D, Lindhagen A. Leg ulcer etiology: a crosssectional population study. *J Vasc Surg* 1991;14:557-564.
168. Nelzén O, Bergqvist D, Lindhagen A, Hallböök T. Chronic leg ulcers: an underestimated problem in primary health care among elderly patients. *J Epidemiol Community Health* 1991;45:184-187.
169. Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens* 2005;18:3S-10S.
170. Nicolaides AN. Investigation of chronic venous insufficiency: a consensus statement. *Circulation* 2000;102:e126-e163.
171. Nicolaides AN. Chronic venous disease and the leukocyte-endothelium interaction: from symptoms to ulceration. *Angiology* 2005;56:S11-19.

172. **Nichols WW.** Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens* 2005;18:3S-10S.
173. **Nunes RLV, Bruschini H, Utsunomia K, Silveira MA, Teodoro WR, Leite KRM, Srougi M.** Influence of a hypercholesterolemic diet on the collagen composition of the bladder wall extracellular matrix in rats. *Histol Histopathol* 2012;27:745-752.
174. **Oklu R, Habito R, Mayr M, Deipolyi AR, Albadawi H, Hesketh R, Walker TG, Linskey KR, Long CA, Wicky S, Stoughton J, Watkins MT.** Pathogenesis of Varicose Veins. *J Vasc Interv Radiol* 2012;23:33-39.
175. **Olsen MH, Christensen MK, Wachtell K, Tuxen C, Fossum E, Bang LE, Wiinberg N, Devereux RB, Kjeldsen SE, Hildebrandt P, Dige-Petersen H, Rokkedal J, Ibsen H.** Markers of collagen synthesis is related to blood pressure and vascular hypertrophy: a LIFE substudy. *J Hum Hypertens* 2005;19:301-307.
176. **O'Shaughnessy AM, Fitzgerald DE.** Natural history of proximal deep vein thrombosis assessed by duplex ultrasound. *Int Angiol* 1997;16:45-49.
177. **Palmier MO, Fulcher YG, Bhaskaran R, Duong VQ, Fields GB, Van Doren SR.** NMR and bioinformatics discovery of exosites that tune metalloelastase specificity for solubilized elastin and collagen triple helices. *J Biol Chem* 2010;285:30918-30930.
178. **Paniagua R, Regadera J, Nistal M, Santamaria L.** Elastic fibres of the human ductus deferens. *J Anat* 1983;137:467-476.
179. **Pascarella L, Schmid Schönbein GW.** Causes of telangiectasias, reticular veins, and varicose veins. *Semin Vasc Surg* 2005;18:2-4.
180. **Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M.** Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med* 2010;16:92-101.
181. **Peyton KJ, Shebib AR, Azam MA, Liu XM, Tulis DA, Durante W.** Bilirubin inhibits neointima formation and vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Front Pharmacol* 2012; 3:48.
182. **Pittaluga P, Chastanet S, Locret T, Rousset O.** Retrospective evaluation of the need of a redo surgery at the groin for the surgical treatment of varicose vein. *J Vas Surg* 2010;51:1442- 1450.
183. **Plate G, Brudin L, Eklöf B, Jensen R, Ohlin P.** Congenital vein valve aplasia. *World J Surg* 1986; 10: 929-934.
184. **Polo JR, Ligerio JM, Diaz-Cartelle J, Garcia-Pajares R, Cervera T, Reparaz L.** Randomized comparison of 6-mm straight grafts versus 6- to 8-mm tapered grafts for brachial axillary dialysis access. *J Vasc Surg* 2004;40:319-324.
185. **Prandoni P, Lensing AWA, Cogo A, et al.** The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996;125:1-7.
186. **Psaila JV, Melhuish J.** Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Br J Surg* 1989;76:37-40.
187. **Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, Marshall A, Boulton AJ, Efron N, Malik RA.** Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes* 2007;56:2148-2154.

188. Raffetto JD. Dermal pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease. *Thromb Res* 2009;123:S66-S71.
189. Raffetto JD, Khalil RA. Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology* 2008;23:85-98.
190. Raffetto JD, Qiao X, Beauregard KG, Khalil RA. Estrogen receptor-mediated enhancement of venous relaxation in female rat: implications in sex-related differences in varicose veins. *J Vasc Surg* 2010;51:972-981.
191. Raffetto JD, Qiao X, Koledova VV, Khalil RA. Prolonged increases in vein wall tension increase matrix metalloproteinases and decrease constriction in rat vena cava: Potential implications in varicose veins: potential Implications in Varicose Veins. *J Vasc Surg* 2008;48:447-456.
192. Rass K, Daschzeren M, Gräber S, Vogt T, Tilgen W, Frings N. Construction and evaluation of a multidimensional score to assess varicose vein severity – The Homburg Varicose Vein Severity Score (HVVSS). *Eur J Dermatol* 2011;21:577-584.
193. Reagan B, Folse R. Lower limb venous dynamics in normal persons and children of patients with varicose veins. *Surg Gynecol Obstet* 1971;132:15-18.
194. Recek C. Venous pressure gradients in the lower extremity and the hemodynamic consequences. *Vasa* 2010;39:292-297.
195. Recek C, Pojer H. Ambulatory pressure gradient in the veins of the lower extremity. *Vasa* 2000;29:187-190.
196. Redondo E, Regadera J, Nistal M, Rey A, España G, Regadera-Sejas FJ, Codesal J. Anatomía y desarrollo del sistema venoso testicular. *Arch Esp Urol* 1988;41:171-178.
197. Regadera J, España G, Rojas MA, Recio JA, Nistal M, Suárez-Quian C. A Morphometric and immunocytochemical study of the fetal, infant, and adult human vas deferens. *J. Androl* 1997; 18:623-636.
198. Regadera J, Nistal M, Paniagua R. Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and Histologic studies with systemic arteriosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:663-667.
199. Reishofer G, Koschutnig K, Enzinger C, Ebner F, Ahammer H. Fractal dimension and vessel complexity in patients with cerebral arteriovenous malformations. *PLoS One* 2012;7:18.
200. Remy-Jardin M, Pistolesi M, Goodman LR, Gefter WB, Gottschalk A, Mayo JR et al. Management of suspected acute pulmonary embolism in the era of CT angiography: a statement from the Fleischner Society. *Radiology* 2007;245:315-329.
201. Reparaz L, Martínez I, Ligeró JM, Landaluce M, Galindo A, Hernández A, Jiménez Cossío JA. La epidemiología y análisis del coste/efectividad de la angiopatía diabética en cirugía vascular. *Angiología* 1992;44:225-233.
202. Reparaz Asensio L, Sánchez García-Cervigón P. El pie diabético. *An Med Interna* 2004;21:417-419.
203. Ritz-Timme S, Lumeier I, Collins MJ. Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br J Dermatol* 2003;149:951-959.
204. Rivas V, Carmona R, Muñoz-Chápuli R, Mendiola M, Nogués L, Reglero C, Miguel-Martín M, García-Escudero R, Dorn GW 2nd, Hardisson D, Mayor F Jr, Penela P. Developmental and

- tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Clin Invest* 2013; 123:4714-4730.
205. **Rodríguez M, Pascual G, Cifuentes A, Perez-Köhler B, Bellón JM, Buján J.** Role of lysyl oxidases in neointima development in vascular allografts. *J Vasc Res* 2011;48:43-51.
206. **Rose SS, Ahmed A.** Some thoughts on the aetiology of varicose veins. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1986;27:534-543.
207. **Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, Verbeuren TJ.** Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond)* 2007;112:229-239.
208. **Sansilvestri-Morel P, Nonotte I, Fournet-Bourguignon MP, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM.** Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins. *J Vasc Res* 1998;35:115-123.
209. **Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM.** Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res* 2001;38:560-568.
210. **Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jaisson S, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM.** Synthesis of collagen is dysregulated in cultured fibroblasts derived from skin of subjects with varicose veins as it is in venous smooth muscle cells. *Circulation* 2002;106:479-483.
211. **Sanz-Garcia C, Ferrer-Mayorga G, González-Rodríguez Á, Valverde AM, Martín-Duce A, Velasco-Martín JP, Regadera J, Fernández M, Alemany S.** Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. *J Biol Chem* 2013;28:15342-15351.
212. **Schultz-Ehrenburg U, Weindorf N, Matthes U, Hirche H.** An epidemiologic study of the pathogenesis of varices. The Bochum study I-III. *Phlebologie* 1992;45:497-500.
213. **Scott TE, LaMorte WW, Gorin DR, Menzoian JO.** Risk factors for chronic venous insufficiency: a dual case-control study. *J Vasc Surg* 1995;22:622-628.
214. **Sindrup JH, Avnstorp C, Steenfoss HH, Kristensen JK.** Transcutaneous PO₂ and laser Doppler blood flow measurements in 40 patients with venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol* 1987;67: 160-163.
215. **Sisto T, Reunanen A, Laurikka J, Impivaara O, Heliövaara M, Knekt P, Aromaa A.** Prevalence and risk factors of varicose veins in lower extremities: mini-Finland health survey. *Eur J Surg* 1995;161:405-414.
216. **Skene AI, Smith JM, Doré CJ, Charlett A, Lewis JD.** Venous leg ulcers: a prognostic index to predict time to healing. *BMJ* 1992;305:1119-1121.
217. **Somers P, Knaapen M.** The histopathology of varicose vein disease. *Angiology* 2006;57:546-555.
218. **Somoza B, Abderrahim F, González JM, Conde MV, Arribas SM, Barry Starcher B, Regadera J, Fernández-Alfonso MS, Díaz-Gil JJ, González MC.** Short-term treatment of spontaneous hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovas Res* 2006;15:764-771.
219. **Sprague AH, Khalil RA.** Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009;78:539-552.

220. **Stansby G.** Women, pregnancy, and varicose veins. *Lancet* 2000;355:1117-1118.
221. **Stein PD, Fowler SE, Goodman LR, Gottshalk A, Hales CA, Hull RD et al.** Multidetector Computed Tomography for Acute Pulmonary Embolism. *N Engl J Med* 2006;354:2317-2327.
222. **Stuart WP, Adam DJ, Allan PL, Ruckley CV, Bradbury AW.** The relationship between the number, competence, and diameter of medial calf perforating veins and the clinical status in healthy subjects and patients with lower-limb venous disease. *J Vasc Surg* 2000;32:138-143.
223. **Stvrtinová V, Kolesár J, Wimmer G.** Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at a department store. *Int Angiol* 1991;10:2-5.
224. **Suzuki M, Unno N, Yamamoto N, Nishiyama M, Sagara D, Tanaka H, Mano Y, Konno H.** Impaired lymphatic function recovered after great saphenous vein stripping in patients with varicose vein: Venodynamic and lymphodynamic results. *J Vas Surg* 2009;50:1085-1091.
225. **Theivacumar NS, Darwood R, Gough MJ.** Neovascularisation and recurrence 2 years after varicose vein treatment for sapheno-femoral and great saphenous vein reflux: a comparison of surgery and endovenous laser ablation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;38:203-207.
226. **Theivacumar NS, Gough MJ.** Influence of warfarin on the success of endovenous laser ablation (EVLA) of the great saphenous vein (GSV). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;38:506e510.
227. **Thomas PR, Nash GB, Dormandy JA.** White cell accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: a possible mechanism for trophic changes in the skin. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:1693-1695.
228. **Thulesius O.** The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency. *Int Angiol* 1996;15:114-118.
229. **Thulesius O, Gjöres JE.** Reactions of venous smooth muscle in normal men and patients with varicose veins. I. Studies on active and passive tension in isolated human vein preparations. *Angiology* 1974;25:145-154.
230. **Torres RA, Drake DA, Solodushko V, Jadhav R, Smith E, Rocic P, Weber DS.** Slingshot isoform-specific regulation of cofilin-mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2424-2431.
231. **Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, Mayhew TM.** Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11:230-237.
232. **van den Akker J, Tuna BG, Pistea A, Sleutel AJ, Bakker EN, van Bavel E.** Vascular smooth muscle cells remodel collagen matrices by long-distance action and anisotropic interaction. *Med Biol Eng Comput* 2012;50:701-715.
233. **van Haarst EP, Liasis N, van Ramshorst B, Moll FL.** The development of valvular incompetence after deep vein thrombosis: a 7 year follow-up study with duplex scanning. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:295-299.
234. **Vanhoutte PM, Corcaud S, de Montrion C.** Venous disease: from pathophysiology to quality of life. *Angiology* 1997;48:559-567.
235. **van Rij AM, Jones GT, Hill BG, Amer M, Thomson IA, Pettigrew RA, Packer SG.** Mechanical inhibition of angiogenesis at the saphenofemoral junction in the surgical treatment of varicose veins: early results of a blinded randomized controlled trial. *Circulation* 2008;118:66-74.

236. Vasquez MA, Munschauer CE. Venous Clinical Severity Score and quality-of-life assessment tools: application to vein practice. *Phlebology* 2008;23:259-275.
237. Vera-Arroyo B, Linares-Palomino JP, Lozano-Alonso S, Moreno-Villalonga JJ, Bravo-Molina A, Ros-Die E. Clinical and health costs impact of progress in diagnosis and treatment in venous thromboembolic disease: evolution in 15 years. *Ann Vasc Surg* 2013;27:1162-1168.
238. Veraart JC, Verhaegh ME, Neumann HA, Hulsmans RF, Arends JW. Adhesion molecule expression in venous leg ulcers. *Vasa* 1993;22:213-218.
239. Vital A, Carles D, Serise JM, Boisseau MC. Evidence for unmyelinated C fibres and inflammatory cells in human varicose saphenous vein. *Int J Angiol* 2010;19:e73-e77.
240. Wali MA, Dewan M, Eid RA. Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int Angiol* 2003;22:188-193.
241. Wali MA, Eid RA. Smooth muscle changes in varicose veins: an ultrastructural study. *J Smooth Muscle Res* 2001; 7:123-135.
242. Wali MA, Eid RA. Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int Angiol* 2002; 21:337-343.
243. Weingarten MS. State-of-the-art treatment of chronic venous disease. *Clin Infect Dis* 2001; 32:949-954.
244. Weingarten MS, Branas CC, Czeredarczuk M, Schmidt JD, Wolferth CC Jr. Distribution and quantification of venous reflux in lower extremity chronic venous stasis disease with duplex scanning. *J Vasc Surg* 1993;18:753-759.
245. Weiss DR, Juchem G, Kemkes BM, Gansera B, Nees S. Extensive deendothelialization and thrombogenicity in routinely prepared vein grafts for coronary bypass operations: facts and remedy. *Int J Clin Exp Med* 2009;2:95-113.
246. Whiston RJ, Hallet MB, Lane IF, Harding KG. Lower limb neutrophil oxygen radical production is increased in venous hypertension. *Phlebology* 1993;8:151-154.
247. Wille-Jørgensen P, Jørgensen T, Andersen M, Kirchhoff M. Postphlebotic syndrome and general surgery: an epidemiologic investigation. *Angiology* 1991;42:397-403.
248. Willén J, Bergqvist D, Hallböök T. Venous insufficiency as a late complication after tibial fracture. *Acta Orthop Scand* 1982;53:149-153.
249. Wong JK, Duncan JL, Nichols DM. Whole-leg duplex mapping for varicose veins: observations on patterns of reflux in recurrent and primary legs, with clinical correlation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;25:267-275.
250. Woodside KJ, Hu M, Burke A, Murakami M, Pounds LL, Killewich LA, Daller JA, Hunter GC. Morphologic characteristics of varicose veins: Possible role of metalloproteinases. *J Vas Surg* 2003;38:162-169.
251. Xiao Y, Huang Z, Yin H, Lin Y, Wang S. In Vitro differences between smooth muscle cells derived from varicose veins and normal veins. *J Vas Surg* 2009;50:1149-1154.
252. Yamamoto N, Unno N, Mitsuoka H, Saito T, Miki K, Ishimaru K, Kaneko H, Nakamura S. Preoperative and intraoperative evaluation of diameter-reflux relationship of calf perforating veins in patients with primary varicose vein. *J Vasc Surg* 2002;36:1225-1230.
253. Zsotér T, Cronin RF. Venous distensibility in patients with varicose veins. *Can Med Assoc J* 1966;94:1293-1297.