

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Correlación entre la ecografía vascular 3D, resonancia  
magnética y tomografía por emisión de positrones en la  
detección y caracterización de la aterosclerosis en aorta de  
conejo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jean Paul Vilchez Tschischke**

Directores

**Borja Ibáñez Cabeza**  
**Carlos Macaya Miguel**

Madrid



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Jean Paul Vilchez Tschischke,  
estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Correlación entre la ecografía vascular 3D, resonancia magnética y tomografía por emisión de  
positrones en la detección y caracterización de la aterosclerosis en aorta de conejo

y dirigida por: Borja Ibáñez Cabeza  
Carlos Macaya Miguel

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 13 de junio de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



**CORRELACIÓN ENTRE LA ECOGRAFÍA VASCULAR 3D, RESONANCIA  
MAGNÉTICA Y TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES EN LA  
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ATROSCLEROSIS EN AORTA  
DE CONEJO**

**Jean Paul Vilchez Tschischke**

Directores:

Borja Ibáñez Cabeza

Carlos Macaya Miguel

2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:**

**Jean Paul Vilchez Tschischke**

Directores:

Borja Ibáñez Cabeza

Carlos Macaya Miguel

**Madrid, 2019**

**A mi familia**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Dr. Borja Ibáñez, por haber sido el artífice de este trabajo, mi mentor, modelo a seguir y especialmente por el gran apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo.

Al Dr. Carlos Macaya, por su confianza y ejemplo.

A Alberto Cecconi, mente creadora, amigo y gestor del proyecto.

A Jesús Mateo, guía imprescindible para el desarrollo del proyecto, gran ejemplo de trabajo y rigurosidad científica.

A Beatriz López, por todo el trabajo dedicado a lo largo de este camino.

A Rodrigo Fernández, por todo el apoyo brindado.

A Milagros y Sebastián, por ser el motor de este proyecto y de mi vida misma, por toda la felicidad que me dan.

A mi madre, Elke, por sus enseñanzas, esfuerzo y compañía.

A mi padre, Orlando, por el apoyo que me ha dado.

## **ÍNDICE GENERAL**

LISTA DE ILUSTRACIONES .....	VIII
LISTA DE TABLAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIV
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XXII
MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. ATEROSCLEROSIS.....	2
1.1.1. Etiología de la aterosclerosis .....	2
1.1.2. Estructura de una arteria normal.....	3
1.1.3. Inicio de la aterosclerosis.....	5
1.1.4. Evolución del ateroma.....	7
1.1.5. Complicaciones de la aterosclerosis .....	10
1.1.6. Clasificación de las lesiones ateroscleróticas .....	12
- Tipo I (lesión inicial): .....	12
- Tipo II:.....	13
- Tipo III (lesión intermedia): .....	13
- Tipo IV (ateroma):.....	13
- Tipo V: .....	13
- Tipo VI (lesión complicada):.....	13
o Tipo VIa: .....	13
o Tipo VIb: .....	13
o Tipo VIc:.....	13
1.1.7. Características de las placas ateroscleróticas de alto riesgo	14
1.2. LA IMAGEN EN LA ATEROSCLEROSIS .....	15
1.2.1. Técnicas no invasivas .....	15
1.2.2. Técnicas invasivas .....	23
1.2.3. Retos actuales en la imagen de la placa aterosclerótica.....	25
1.3. MODELOS DE ATEROSCLEROSIS EN ANIMALES .....	27
1.3.1. Modelos en ratones.....	28
1.3.2. Modelos en conejos .....	28
1.3.3. Modelos en cerdos.....	30
1.4. EL CONCEPTO DE LA PLACA VULNERABLE .....	31
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	32
2. HIPÓTESIS .....	34

3. OBJETIVOS .....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	36
4.2. DETALLE DE LOS MÉTODOS.....	37
4.2.1. Denudación endotelial de aorta.....	37
4.2.2. Ecografía vascular.....	39
4.2.3. Resonancia Magnética.....	40
4.2.4. Tomografía computarizada/tomografía por emisión de positrones con <sup>18</sup> F-fluorodeoxiglucosa .....	41
4.2.5. Histología .....	42
4.2.6. Análisis del plasma.....	44
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
5. RESULTADOS .....	46
5.1. Estudio de la aorta con ecografía 3D.....	46
5.2. Estudio de la aorta con RM.....	49
5.3. Estudio de la aorta con PET .....	59
5.4. Correlación del PET con los estudios anatómicos de placa .....	65
5.5. Determinaciones analíticas.....	72
6. DISCUSIÓN .....	74
7. LIMITACIONES .....	86
8. CONCLUSIONES.....	88
9. BIBLIOGRAFÍA .....	89

## **LISTA DE ILUSTRACIONES**

Figura 1: Estructura normal de la pared arterial.....	4
Figura 2: Representación esquemática de los cambios que suceden en la pared arterial con la aterosclerosis .....	9
Figura 3: Diseño del estudio .....	37
Figura 4: Procedimiento de denudación arterial con balón .....	38
Figura 5: Preparación del conejo para la ecografía vascular 3D .....	39
Figura 6: Preparación del conejo para la resonancia.....	40
Figura 7: Preparación de las muestras para histología.....	43
Figura 8: Correlación entre la ecografía 3D y la histología .....	44
Figura 9: Evolución del volumen de placa por ecografía 3D .....	47
Figura 10: Comparación de la medición por histología con la ecografía vascular 3D.....	47
Figura 11: Correlación entre el volumen de placa por ecografía 3D y el volumen total de la pared aórtica.....	48
Figura 12: Correlación entre el volumen de placa por ecografía 3D y el volumen de pared de sus segmentos correspondientes por resonancia ..	48
Figura 13: Medición de la pared arterial con la resonancia.....	49
Figura 14: Evolución del volumen total de la pared de la aorta .....	52
Figura 15: Evolución del área promedio de la pared de la aorta.....	52
Figura 16: Evolución del volumen luminal de la aorta.....	53
Figura 17: Evolución del área luminal media de la aorta .....	53
Figura 18: Evolución del volumen total de la aorta .....	54
Figura 19: Evolución del índice normalizado de la pared (NWI) .....	54
Figura 20: Evolución del grosor máximo de la pared arterial .....	55
Figura 21: Evolución del grosor medio de la pared arterial.....	55
Figura 22: Evolución del grosor mínimo de la pared arterial.....	56
Figura 23: Correlación de las mediciones iniciales con las finales del NWI y el volumen de pared aórtica.....	56
Figura 24: Correlación entre el NWI inicial y su variación en el tiempo ....	57

Figura 25: Concordancia del área de la pared entre resonancia e histología .....	57
Figura 26: Correlación del área de la pared entre resonancia e histología .....	58
Figura 27: Evolución de la captación máxima en el PET .....	61
Figura 28: Evolución de la captación media en el PET .....	61
Figura 29: Concordancia entre la captación máxima y media en el PET ..	62
Figura 30: Concordancia entre las medidas del PET corregidas y sin corregir.....	63
Figura 31: Correlación entre el PET y el área por histología .....	64
Figura 32: Correlación entre el PET y área relativa de macrófagos por inmunohistoquímica .....	64
Figura 33: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de pared por resonancia .....	65
Figura 34: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de la pared por resonancia, datos agrupados .....	66
Figura 35: Correlación entre la captación en el PET y el grosor máximo de pared por resonancia .....	66
Figura 36: Correlación entre la captación en el PET y el índice normalizado de la pared (NWI).....	67
Figura 37: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de placa por ecografía 3D .....	67
Figura 38: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de placa por ecografía 3D .....	68
Figura 39: Correlación entre la captación máxima en el PET inicial y la variación del índice normalizado de la pared (NWI).....	69
Figura 40: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el grosor máximo de la pared arterial.....	69
Figura 41: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el volumen luminal .....	70
Figura 42: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el volumen de pared .....	70
Figura 43: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación del volumen de placa por ecografía.....	71

Figura 44: Evolución del perfil lipídico.....	73
Figura 45: Comparación entre la resonancia y la ecografía en lo referente a aterosclerosis precoz y tardía .....	78
Figura 46: Comparación de las imágenes obtenidas en aterosclerosis precoz, entre la resonancia y la ecografía .....	78
Figura 47: Representación esquemática de la medición de placas ateroscleróticas de diferente tamaño con ecografía y resonancia .....	79
Figura 48: Correlación de la captación del PET con el área de la tinción de RAM-11.....	82

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1: Ventajas y desventajas de los diferentes modelos animales de aterosclerosis.....	28
Tabla 2: Mediciones de resonancia magnética control, 18 semanas y 35 semanas .....	51
Tabla 3: Captación de $^{18}\text{F}$ -FDG en el PET inicial, final y control.....	60
Tabla 4: Determinaciones analíticas iniciales y finales .....	72

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**3D:** tridimensional

**<sup>18</sup>F-FDG:** <sup>18</sup>Fluor-Fluorodesoxiglucosa

**AIT:** ataque isquémico transitorio

**CML:** células musculares lisas

**COX:** ciclooxigenasa

**GM-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular 1

**IL:** interleuquina

**IMT:** grosor de íntima media

**IQR:** rango intercuartílico

**IVUS:** ultrasonidos intravasculares

**JAMs:** moléculas de adhesión de la unión

**KLF2:** factor tipo Kruppel 2

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LTc:** linfocitos T citotóxicos

**LTh:** linfocitos T-helper

**MCP-1:** proteína quimiotáctica de monocitos 1

**M-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos

**MMPs:** metaloproteinasas de la matriz

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NOS:** óxido nítrico sintasa

**NWI:** índice de pared normalizado (normalized wall index)

**NZW:** New Zealand White

**OCT:** tomografía de coherencia óptica

**PCR:** proteína C-reactiva

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PECAM-1:** molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1

**PET:** tomografía por emisión de positrones

**PET/TC:** tomografía por emisión de positrones asociada a tomografía computarizada

**PLGF:** factor de crecimiento placentario

**PMN:** leucocitos polimorfonucleares

**PSGL-1:** ligando-1 de la selectina-P

**RM:** resonancia magnética

**ROI:** región de interés (region of interest)

**SUV:** valores estandarizados de captación

**TAC:** tomografía axial computarizada

**TBR:** proporción objetivo fondo (target to background ratio)

**TGF- $\beta$ :** factor transformador de crecimiento-beta

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral-alfa

**VCAM-1:** molécula de adhesión celular vascular 1

**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad

## **RESUMEN**

# **CORRELACIÓN ENTRE LA ECOGRAFÍA VASCULAR 3D, RESONANCIA MAGNÉTICA Y TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES EN LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS EN AORTA DE CONEJO**

## **INTRODUCCIÓN**

La aterosclerosis es una enfermedad que genera un elevado coste tanto en lo económico como en lo social, debido a sus principales consecuencias, el infarto de miocardio y el ictus. Su estudio ha demostrado mejorar la predicción de eventos clínicos sobre los factores de riesgo convencionales, abriendo la posibilidad de incluir la imagen como parte de las estrategias de prevención, especialmente desde las fases más precoces de la enfermedad.

La aterosclerosis comienza con la formación de estrías grasas en la pared vascular, que evolucionan acumulando colesterol y células inflamatorias, especialmente monocitos. Es un proceso dinámico y progresivo, en el que la actividad inflamatoria juega un papel fundamental. Existen múltiples técnicas de imagen, tanto invasivas como no invasivas, que permiten evaluar las características morfológicas y funcionales de la placa aterosclerótica, incluso desde sus estadios iniciales. Realizar una comparación directa entre todas en un escenario clínico resulta complejo, dada la limitada disponibilidad de algunas de las técnicas, ya sea por los costes, o el tiempo de exploración necesario, y en algunos casos, por la limitación para indicar un procedimiento invasivo o la administración de radiación que implicarían. Estas cuestiones son además de mayor relevancia si lo que estudiamos es la aterosclerosis en sus estadios más precoces. Los modelos preclínicos ofrecen menos limitaciones en este sentido, pudiendo además disponer del *gold standard* de la histología. Comparar estas técnicas a nivel preclínico ofrecería información de relevancia sobre su utilidad en la práctica habitual, así como para guiar el diseño de futuros estudios clínicos en aterosclerosis y riesgo cardiovascular precoz.

El modelo de aterosclerosis en conejos New Zealand White se ha utilizado en diferentes estudios, tanto para determinar las características de la aterosclerosis como para el estudio de fármacos que puedan modificar el curso de la enfermedad. Sin embargo, su uso para el estudio de aterosclerosis precoz con técnicas de imagen multimodal ha sido más limitado.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El estudio se basa en dos hipótesis principales. La primera, que la ecografía vascular 3D permite detectar de manera más precisa la presencia de aterosclerosis en estadios precoces comparada con la resonancia magnética. La segunda que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG puede predecir la progresión de la enfermedad aterosclerótica. Para esto se han realizado estudios seriados con ecografía vascular 3D, resonancia magnética y PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG; correlacionando los hallazgos de las diferentes técnicas entre sí. Estos datos se han analizado para determinar la capacidad del PET en predecir la progresión de la aterosclerosis.

## **MÉTODOS**

Se utilizaron 10 conejos New Zealand White para el desarrollo del modelo, administrándoles dieta hipercolesterolémica al 0.2% y realizando un procedimiento de denudación endotelial aórtica. Se realizaron ecografía vascular 3D para la medición del volumen de placa, resonancia magnética para la medición del volumen de pared del vaso, el volumen de luz y el índice de pared normalizado (NWI), y PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG para la obtención del valor de captación estandarizada medio y máximo. Estas pruebas se realizaron en las semanas 18 y 35 del estudio. Posteriormente se sacrificaron los animales para la obtención de muestras para histología e inmunohistoquímica. Además, se realizaron resonancias a 4 conejos sanos como control y se utilizaron datos históricos de 5 conejos sanos como control de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el PET.

Los datos se presentan como medias con desviación estándar y/o mediana con rango intercuartílico, las comparaciones estadísticas con el

test t de Student para muestras apareadas y no apareadas según corresponde, y las correlaciones con el test de Pearson. La concordancia se evaluó con el test de Bland-Altman.

## RESULTADOS

Finalizaron el estudio 8 conejos. Con la ecografía 3D se observó una mediana de crecimiento relativo de la placa aterosclerótica del 172% ( $p = 0.002$ ). Con la resonancia se objetiva que el volumen de la pared es un 96% mayor respecto a los controles ( $p < 0.001$ ) y evoluciona reduciéndose un 6% ( $p = 0.023$ ). La luz arterial es 22% mayor que en los controles ( $p = 0.21$ ) y en el seguimiento se reduce un 23% ( $p < 0.001$ ). El índice normalizado de la pared (NWI) es 38% mayor que en los controles ( $p < 0.001$ ), y se incrementa un 12% ( $p < 0.001$ ). Existe una adecuada concordancia y correlación entre las medidas de la resonancia y la histología ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.04$ ).

El SUVmax del PET es 64% mayor que en los controles ( $p = 0.009$ ), posteriormente se incrementa un 15% ( $p = 0.12$ ). No existe correlación entre la captación en el PET con el volumen de la placa por ecografía ( $r = 0.34$ ), el volumen de la pared por resonancia ( $r = 0.19$ ), ni el área medida por histología ( $r = -0.09$ ); tampoco encontramos relación con la presencia de macrófagos medida con la tinción de RAM-11 ( $r = 0.18$ ).

No existe correlación entre el volumen de placa por ecografía vascular 3D y el volumen de pared por resonancia ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.45$ ). Existe una moderada correspondencia si se analizan las placas detectadas por ecografía correlacionándolas específicamente con las de la resonancia ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.03$ ).

La captación inicial del PET presenta una tendencia no significativa a correlacionar con el incremento del volumen de placa medido por ecografía vascular 3D ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.16$ ). La captación en el PET inicial no predice la variación del NWI ( $r = 0.12$ ), del grosor máximo de la pared ( $r = 0.05$ ), ni del volumen de pared ( $r = 0.04$ ) medidos por resonancia magnética.

## CONCLUSIONES

En un modelo de aterosclerosis en conejo inducida con dieta grasa y denudación endotelial, la ecografía vascular tridimensional permite detectar y cuantificar la aterosclerosis precoz en territorio de aorta abdominal, así como cuantificar el volumen de placa aterosclerótica (y por tanto sus cambios) con mayor precisión que la resonancia magnética. La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en aorta abdominal evaluada mediante PET es significativamente más elevada en conejos que ha recibido una dieta rica en grasa que en aquellos que han recibido dieta control.

La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en aorta abdominal evaluada mediante PET no está correlacionada con el volumen ni con el grosor de pared arterial. Esta ausencia de correlación existe cuando la pared arterial se cuantifica por ecografía vascular tridimensional, por resonancia magnética o por histología. La intensidad de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG tampoco se asocia con la tasa de crecimiento de las placas ateroscleróticas cuantificada tanto mediante ecografía vascular tridimensional como mediante resonancia magnética.

**ABSTRACT**

# **RELATIONSHIP BETWEEN 3D VASCULAR ULTRASOUND, MAGNETIC RESONANCE AND POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY IN DETECTION AND CHARACTERIZATION OF RABBIT'S AORTA ATHEROSCLEROSIS**

## **INTRODUCTION**

Atherosclerosis is a disease that generates high economic and social costs, due to its main consequences, myocardial infarction and stroke. Its study has demonstrated to predict better clinical events over conventional risk factors, giving the possibility to include imaging tests as part of the prevention strategies, especially in early stages of the disease.

Atherosclerosis starts with the formation of fatty streaks in the vascular wall, evolves accumulating cholesterol and inflammatory cells, specially monocytes. It is an active process, in which the inflammatory activity plays an important role. There are different imaging techniques, invasive and non-invasive, that evaluate the morphological and functional characteristics of the atherosclerotic plaque. Direct comparison between them result complex at a clinical level, given the limited availability of some of the techniques, both due to the costs, or time needed for the exploration, and in some cases, the limitation to indicate invasive procedures, or the radiation exposure that they involve. These issues are even of greater relevance if we study early atherosclerosis phases. Preclinical models offer less limitations in this sense, with the benefit of having the gold standard of histology. Comparing these techniques at a preclinical level offer relevant information about their utility in clinical practice, and also in the design of future clinical studies in atherosclerosis and early cardiovascular risk.

The atherosclerosis model in New Zealand White rabbits has been used in different studies, for both describe atherosclerosis characteristics and to test drugs that can modify the course of the disease. However, its use for the study of early atherosclerosis with a multimodality imaging approach has been more limited.

## **HYPOTHESIS AND OBJECTIVES**

This study is based in two main hypotheses. The first, that 3D vascular ultrasound detects more precisely the presence of early atherosclerosis compared with magnetic resonance. The second one, that  $^{18}\text{F}$ -FDG can predict progression of atherosclerotic disease. For this we have performed in a serial fashion 3D vascular ultrasound, magnetic resonance and  $^{18}\text{F}$ -FDG PET scan; correlating the findings of the different techniques between them and validating them with histological findings. These data have been analysed to determine the capacity of PET to predict the progression of atherosclerosis.

## **METHODS**

Ten New Zealand White rabbits were used to develop the model, they received 0.2% hypercholesterolemic diet and an aortic endothelial denudation procedure. 3D vascular ultrasound to study plaque volume, magnetic resonance to measure aortic wall and lumen volume, and normalized wall index; and  $^{18}\text{F}$ -FDG PET scan to evaluate mean and maximum standard uptake. These tests were performed at weeks 18 and 35 of the study. Afterwards the animals were sacrificed for histological and immunohistochemical staining. Also, magnetic resonance imaging was performed in four healthy rabbits as control, and historical data of 5 healthy rabbits was used as control of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET uptake.

Data is presented as mean with standard deviation and/or median and interquartile range, statistical comparisons with t-test for paired or unpaired samples as it corresponds, and correlations with Pearson's test. Agreement was evaluated with Bland-Altman's test.

## **RESULTS**

The study was finished by 8 rabbits. With 3D echography the atherosclerotic plaque relative median growth was of 172% ( $p = 0.002$ ). With magnetic resonance we observed that aortic wall volume is 96% greater than in controls ( $p < 0.001$ ) and evolves by a 6% reduction ( $p = 0.023$ ). Arterial lumen is 22% bigger than controls ( $p = 0.21$ ) and it reduces 23% ( $p < 0.001$ ) at follow

up. The normalized wall index (NWI) is 38% greater than controls ( $p < 0.001$ ), and increases 12% more ( $p < 0.001$ ). It does exist a good agreement and correlation between the resonance and histology measurements ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.04$ ).

PET maximum standardized uptake (SUVmax) is 64% greater than controls ( $p = 0.009$ ), increasing 15% afterwards ( $p = 0.12$ ). There is no relationship between PET uptake and plaque volume by echography ( $r = 0.34$ ), wall volume by resonance ( $r = 0.19$ ), nor the area measured by histology ( $r = -0.09$ ). No correlation with the presence of macrophages measured with RAM-11 staining ( $r = 0.18$ ) was found.

There is no correlation between the plaque volume by 3D vascular ultrasound and the wall volume by resonance ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.45$ ). There is a moderate relationship when we limit the analysis to individual plaques detected by echography and compare them with their corresponding regions in the resonance ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.03$ ).

PET uptake has a non-significant tendency to correlate with plaque volume increase measured with 3D vascular ultrasound ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.16$ ). Initial PET uptake does not predict variations in NWI ( $r = 0.12$ ), maximum wall thickness ( $r = 0.05$ ), nor wall volume ( $r = 0.04$ ) measured by magnetic resonance.

## **CONCLUSIONS**

In the model of atherosclerosis induced by fat diet and endothelial denudation, 3D vascular ultrasound allows early atherosclerosis detection and its quantification in abdominal aorta territory. Moreover; it allows the quantification of the atherosclerotic plaque volume (and therefore its changes and progression) more precisely than magnetic resonance.  $^{18}\text{F}$ -FDG PET uptake in abdominal aorta is significantly higher in rabbits that received fat rich diet than in rabbits that have received control diet.

$^{18}\text{F}$ -FDG PET uptake in abdominal aorta does not correlate with the volume nor the thickness of the arterial wall. This lack of correlation appears

when the arterial wall is quantified by 3D vascular ultrasound, magnetic resonance or histology. The intensity of the  $^{18}\text{F}$ -FDG PET uptake does not associate with the atherosclerotic plaque growth rate detected by 3D vascular ultrasound or magnetic resonance.

# **MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL**

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. ATEROSCLEROSIS

La patología cardiovascular es la principal causa de muerte a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, donde la prevalencia de esta patología va en aumento. En el año 2016 murieron en el mundo 17.9 millones de personas por enfermedades cardiovasculares, siendo el 85% de estas muertes debidas a infarto e ictus (1). La patología subyacente es la aterosclerosis, a la que podríamos considerar la pandemia de nuestro tiempo. A lo largo de los últimos años hemos logrado tener una mejor comprensión de esta patología, lo que ha permitido un desarrollo importante en la prevención y tratamiento precoz de estos pacientes.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica (2), que tiene manifestaciones agudas y crónicas. La afección aparece antes de lo que previamente pensábamos, desde la segunda a tercera década de la vida ya aparecen engrosamientos de la íntima de las arterias, aunque los verdaderos síntomas aparecerán varias décadas después. Recientemente se ha demostrado que población de edad media, sin patología cardiovascular conocida, presenta una alta prevalencia de aterosclerosis subclínica (3). Sin embargo, no todos los individuos con aterosclerosis van a desarrollar enfermedades cardiovasculares, ni la enfermedad se desencadena exclusivamente en lesiones obstructivas o severas, por lo que es importante estudiar marcadores capaces de predecir su comportamiento y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares.

### 1.1.1. Etiología de la aterosclerosis

Existen múltiples factores de riesgo que se pueden separar en dos grupos, el primero corresponde a aquellos que tienen un importante componente genético, por ejemplo: niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL), niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), niveles elevados de lipoproteína (a) en plasma, hipertensión arterial, elevación de la homocisteína, historia familiar, diabetes y

obesidad, depresión, género masculino, inflamación sistémica, síndrome metabólico. Por otro lado están los factores de riesgo ambientales que contribuyen también de forma significativa a la formación de placas ateroscleróticas, por ejemplo dieta rica en grasas, fumar, niveles bajos de antioxidantes y algunos procesos infecciosos (*Chlamydia pneumoniae*) (4).

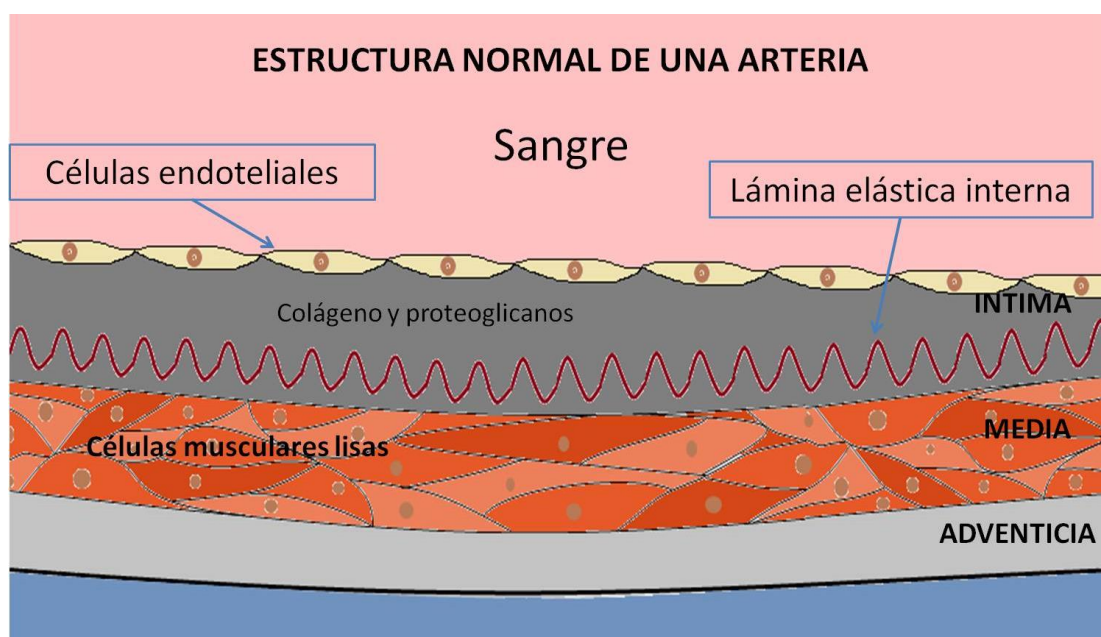
### 1.1.2. Estructura de una arteria normal

Las células endoteliales de la íntima arterial son las que se encuentran en contacto con la sangre, siendo una de sus funciones más importantes la de evitar la coagulación de la sangre, esta capacidad deriva en parte gracias a la expresión de proteoglicanos de heparán-sulfato en su superficie; estas moléculas actúan como cofactor de la antitrombina III, permitiendo que ésta inactive a la trombina. También contienen trombomodulina, que se une a la trombina, activando las proteínas C y S, que tienen propiedades antitrombóticas (5). Si un trombo comienza a formarse, las células endoteliales también poseen mecanismos fibrinolíticos potentes, produciendo activadores del plasminógeno, lo que permite la conversión de éste en plasmina, que es una enzima fibrinolítica.

Las células musculares lisas (CML) son las encargadas de regular el flujo sanguíneo, especialmente a nivel arteriolar; en arterias de mayor diámetro, su contracción excesiva puede ser causa de vasoespasmo. Estas células pueden migrar y proliferar, lo que contribuye a la formación de lesiones intimales hiperplásicas, incluyendo aterosclerosis, reestenosis intrastent o hiperplasia endotelial en puentes venosos. La muerte de células musculares lisas puede promover la desestabilización de placas ateromatosas o favorecer el remodelado ectásico y por último la formación de aneurismas (5).

Las arterias normales tienen una estructura trilaminar (Figura 1), la capa interna, denominada íntima, se compone de la una monocapa de células endoteliales que van sobre una membrana de colágeno no fibrilar (especialmente tipo IV), laminina, fibronectina y otras moléculas de matriz extracelular. Con el paso de los años la íntima adquiere una estructura más compleja, incluyendo células musculares lisas y formas de colágeno fibrilar

(tipo I y III); este proceso se denomina engrosamiento difuso de la íntima, y es el que da las características de la íntima de la mayoría de personas adultas. Algunas regiones arteriales sufren mayor engrosamiento que otras, aún en ausencia de aterosclerosis. Este engrosamiento no necesariamente significa acumulación de lípidos y puede ocurrir en personas sin aterosclerosis. La membrana elástica interna se une a la íntima y sirve como límite entre ésta y la túnica media (5).



**Figura 1: Estructura normal de la pared arterial**

La túnica media es una estructura adaptada para almacenar la energía cinética de la sístole ventricular. En las arterias de gran calibre se encuentra muy desarrollada, con capas concéntricas de células musculares lisas intercaladas con capas de matriz extracelular rica en elastina; en los vasos de menor calibre esta capa se encuentra menos organizada, siendo una matriz continua y no laminar. El límite externo de la túnica media es la membrana elástica externa (5).

La capa más externa es la adventicia, que contiene fibras de colágeno más separadas que en la íntima, aquí además llegan los *vasa vasorum* y las terminaciones nerviosas; además presenta fibroblastos y mastocitos, éstos últimos son altamente prevalentes en placas ateroscleróticas carotídeas y se

asocian con la densidad de microvasos; además el número de mastocitos se asoció en un modelo multivariable con mayores eventos cardiovasculares (6).

### **1.1.3. Inicio de la aterosclerosis**

#### **1.1.3.1. Acumulación de lípidos extracelulares**

El conocimiento sobre el inicio de la aterosclerosis humana es complejo, se basa en estudios observacionales y hallazgos en modelos animales. Con una dieta aterogénica, rica en colesterol y grasas saturadas, pequeñas lipoproteínas se depositan en la íntima, uniéndose a los proteoglicanos y se acumulan en agregados por largos periodos de tiempo. Las partículas de lipoproteínas unidas a proteoglicanos son susceptibles de oxidarse, lo que contribuye a la patogénesis de la aterosclerosis (4). Otros estudios sugieren que existe una mayor permeabilidad para las LDL en sitios donde existe más predilección para la formación de placas ateroscleróticas (5).

#### **1.1.3.2. Reclutamiento y migración de leucocitos**

Normalmente las células endoteliales evitan la adhesión con los leucocitos; y generalmente, el reclutamiento de leucocitos se produce en vénulas post-capilares; sin embargo, después del inicio de la acumulación de lípidos, los leucocitos se unen a las células endoteliales y logran penetrar a la íntima por diapédesis, donde comienzan a acumular lípidos y forman las células espumosas (7). Existen varios pasos para que se produzca el reclutamiento de los leucocitos. Inicialmente actúan las selectinas, especialmente la P-selectina que actúa a través de su unión con el ligando-1 de la selectina-P (PSGL-1); en un modelo de conejo ésta aparece una semana después de iniciada la dieta aterogénica, mientras que la acumulación de macrófagos se produce a partir de la segunda semana, sugiriendo que la expresión de selectina-P es uno de los eventos primarios de la aterosclerosis (8). También actúa la selectina-E (endotelial), que se sintetiza cuando existe un proceso inflamatorio, por lo que su papel sea probablemente más tardío, encargándose de reclutar polimorfonucleares (PMN) (9). Otras moléculas con un rol importante en este proceso son la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1 (PECAM-1, CD31), cuyos niveles

elevados se han asociado con enfermedad coronaria severa, las moléculas de adhesión de la unión (JAMs) y las conexinas (9).

Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos deben recibir una señal para atravesar y llegar a la pared arterial, actividad guiada por citoquinas quimiotácticas, entre las más importantes están la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) que es producida por el endotelio en respuesta a lipoproteínas oxidadas y otros estímulos inflamatorios; y las quimioquinas selectivas de linfocitos (IP-10 o CXCL10, I-TAC o CXCL-11 y MIG o CXCL9). En la retención de los macrófagos en las placas está implicada netrina-1 que interactúa con su receptor UNC5b, inducida por hipoxia (5).

#### **1.1.3.3. Focalidad en la formación de las lesiones**

Es difícil explicar la heterogeneidad espacial de la aterosclerosis, ya que las moléculas que dañan el endotelio se distribuyen a lo largo de todo el árbol vascular, pero las placas de ateroma son focales. La predilección por segmentos proximales y en zonas de bifurcación apoyan las teorías hidrodinámicas del desarrollo de lesiones (10). Las arterias con escasas ramas, como por ejemplo la arteria mamaria interna y la radial, casi no presentan aterosclerosis. Ciertos datos *in vitro* sugieren que el flujo laminar puede aumentar la expresión de genes que protegen frente a la aterosclerosis, incluyendo la superóxido dismutasa, la sintetasa del óxido nítrico y especialmente el factor Kruppel-like 2 (KLF2), éste último se ha relacionado con el efecto protector de las estatinas frente a la aterosclerosis (11). La superóxido dismutasa puede reducir el estrés oxidativo catabolizando el ion superóxido. La sintetasa endotelial del óxido nítrico se encarga de la producción del óxido nítrico, que a parte de su efecto vasodilatador, interfiere con la transcripción del regulador nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), un regulador de varios genes de respuesta inflamatoria (5).

#### **1.1.3.4. Acumulación intracelular de lípidos: formación de células espumosas**

Los monocitos, una vez reclutados en la íntima arterial, se pueden llenar de lípidos y formar las células espumosas, un mecanismo no dependiente de los receptores de LDL. Los principales receptores implicados son el scavenger-

A, CD36 y macrosialina, este último tiene una afinidad especial por las formas oxidadas de LDL. La esfingomielinasa puede promover la agregación de lipoproteínas, lo que genera una mayor retención y captación de macrófagos (4).

Las células espumosas en la íntima se pueden replicar, lo que contribuye de manera significativa en la formación de la placa aterosclerótica; los factores que favorecen la proliferación de macrófagos son el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos (GM-CSF) y la interleuquina 3 (IL-3). En un modelo de ratón se demostró que la administración de 5-fluorouracilo, que tiene efecto inhibitor de la proliferación de monocitos, disminuyó la tasa y el número de macrófagos, lo que determinó lesiones más pequeñas (12).

#### **1.1.4. Evolución del ateroma**

##### **1.1.4.1. Mecanismos inflamatorios en la aterogénesis**

Las células espumosas, aparte de ser un reservorio de lípidos, son una fuente de mediadores proinflamatorios y especies oxidativas, como el ion superóxido y el ácido hipoclorítico. La unión de todos estos mediadores, dentro de lo que se denomina inmunidad innata (no depende de estímulos antigénicos) promueven la inflamación y progresión de la placa. Además, las células dendríticas en las lesiones ateroscleróticas pueden presentar antígenos a las células T, que constituyen una minoría importante dentro de la placa aterosclerótica; las células T activadas secretan citoquinas que modulan la aterogénesis (13).

Los linfocitos T helper (CD4) se dividen en dos tipos, el tipo 1 (LTh-1) que elaboran citoquinas proinflamatorias como interferon- $\gamma$ , linfoxina, CD40 ligando y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Sustancias que activan las células en la pared vascular y dirigen las alteraciones en la biología de la placa que pueden llevar a la desestabilización de la misma e incrementar su trombogenicidad. Los linfocitos T helper tipo 2 (LTh-2) producen citoquinas como la interleuquina 10 (IL-10), que inhibe la inflamación. Los linfocitos T citotóxicos (LTc, CD8) expresan el Fas ligando y otros factores citotóxicos que

promueven la citólisis y la apoptosis celular, contribuyendo a la progresión y ruptura de la placa. Por último, los linfocitos T reguladores producen el factor transformante del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10, teniendo efectos antiinflamatorios. Desde el punto de vista de la inmunidad humoral, los linfocitos B1 producen anticuerpos que reconocen las LDL oxidadas, siendo protectores contra la aterosclerosis. Los linfocitos B2 promueven la producción de citoquinas inflamatorias (5).

#### ***1.1.4.2. Proliferación, migración y muerte de las células musculares lisas***

Las CML en la íntima aterosclerótica tienen un fenotipo menos maduro que las normales de la capa media de arterias normales, mostrando características embrionales, más retículo endoplásmico rugoso y menos fibras contráctiles. La replicación de las células musculares lisas en la placa de ateroma no parece constante, sino que se produce en oleadas. Las CML juegan un papel importante en propagar la inflamación durante el desarrollo de la aterosclerosis, regulando la secreción de citoquinas y receptores de membrana (14). Los LTc que expresan Fas ligando, se pueden unir a Fas en la superficie de las CML, lo que, junto con las citoquinas proinflamatorias, induce la apoptosis de las CML (15,16).

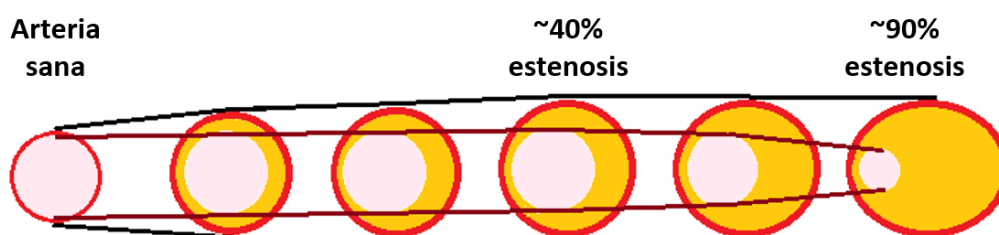
#### ***1.1.4.3. Matriz extracelular***

Una parte importante del contenido de la placa aterosclerótica es la matriz extracelular, sus principales componentes incluyen colágeno (tipo I y III), proteoglicanos (versicano, biglicano, agregano y decorin) y elastina. Las CML son las encargadas de producir estas sustancias, como lo harían para mantener una arteria normal. Los estímulos para la producción excesiva de colágeno incluyen el PDGF y TGF- $\beta$ . Ciertos componentes de la matriz extracelular, especialmente los proteoglicanos, se unen a las lipoproteínas, aumentando su capacidad de permanecer en la íntima y su sensibilidad a sufrir estrés oxidativo y glicación (unión no enzimática con azúcares). Estos productos incrementan la inflamación en la placa (17). En la placa también existe destrucción de estas sustancias por procesos catabólicos, especialmente por metaloproteinasas de la matriz (MMPs). La destrucción de

macromoléculas de la matriz extracelular contribuye a la migración de CML, que penetran en la íntima media, atravesando la lámina elástica interna.

La destrucción de la matriz extracelular también juega un papel importante en el remodelado arterial que acompaña al crecimiento de la lesión. Al principio, las lesiones ateroscleróticas crecen hacia el exterior de las arterias, lo que lleva a un aumento del calibre de la arteria, este llamado remodelado positivo, implica cambios en la matriz extracelular que permita el crecimiento circunferencial de la misma, sin afectar el área luminal.

En la Figura 2 se representa esquemáticamente como la estenosis luminal se puede apreciar sólo cuando la carga de la placa supera el 30 - 40% del área de la arteria, definido por la lámina elástica interna (18). Lo que sucede previamente es un remodelado positivo, que incluso incrementa la luz arterial con respecto a una arteria sana. En un modelo de aterosclerosis en primates, con dieta hipercolesterolémica durante un tiempo prolongado (4 a 6 años), se objetivó un incremento de la luz arterial a pesar de un crecimiento intimal importante, observándose además un adelgazamiento de la capa media, efecto producido, al menos en parte, por la presión hemodinámica que reciben los vasos (19).



**Figura 2: Representación esquemática de los cambios que suceden en la pared arterial con la aterosclerosis**

*Los estadios iniciales se pueden asociar incluso con sobrecompensación, aproximadamente al alcanzar el 40% de estenosis la compensación es insuficiente y la luz se reduce. Modificado de Glagov y colaboradores (18).*

#### **1.1.4.4. Angiogénesis en las placas**

El crecimiento de las placas ateroscleróticas genera hipoxia dentro de la misma, lo que desencadena infiltración de células inflamatorias,

promoviendo la producción del factor inducido por hipoxia (HIF-1), que finalmente promueve la producción de péptidos angiogénicos, como son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PLGF) y la oncostatina M, lo que a su vez estimula su propia microcirculación conforme van creciendo (20). Estos microvasos permiten la migración de leucocitos en la placa. En placas humanas avanzadas, el endotelio microvascular expresa moléculas de adhesión para células mononucleares como VCAM-1, más que en el endotelio macrovascular. Además, permiten la nutrición de la placa. La administración de inhibidores de la angiogénesis en un modelo de aterosclerosis de ratón limita el crecimiento de las lesiones (20).

#### **1.1.4.5. Mineralización de la placa**

Las placas frecuentemente presentan calcificaciones durante su evolución. Algunas poblaciones de CML pueden fomentar la calcificación de la placa a través de la secreción de citoquinas, como las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), homólogos del TGF- $\beta$ . La activación del receptor NF- $\kappa$ B ligando (RANKL) promueve la mineralización a través de la vía de BMP-4. Osteoprotegerin antagoniza la mineralización por inhibir RANKL (5).

#### **1.1.5. Complicaciones de la aterosclerosis**

El proceso aterosclerótico dura muchos años, etapa durante la cual los pacientes se encuentran asintomáticos. Como ya hemos descrito, después de que la placa supera la capacidad de remodelado positivo de la arteria, comienza a verse afectada la luz vascular (18). En este periodo, el crecimiento de la placa no es continuo, alternando periodos de estabilidad con periodos de rápido crecimiento. Lesiones de más del 60% pueden causar alteraciones del flujo cuando se incrementa la demanda. Los síndromes coronarios agudos en muchos casos se producen sin episodios de angina previa, debido a ruptura de la placa y formación de trombo (17).

Existen diferentes modos en los que la ruptura de la placa provoca la trombosis coronaria. El más frecuente es la ruptura de la cápsula fibrosa de la placa; en segundo lugar, se encuentra la erosión superficial de la íntima, más frecuente en mujeres (21). La ruptura de la placa probablemente refleja un

desbalance entre las fuerzas que empujan la cápsula y la resistencia mecánica de ésta. Dado que las formas intersticiales del colágeno son las encargadas de dar la resistencia mecánica a la placa, es probable que el metabolismo del colágeno esté implicado en el riesgo de ruptura de la misma (17).

Las enzimas encargadas de degradar la matriz extracelular debilitan la placa, haciéndola susceptible de romperse. Los macrófagos sobre expresan metaloproteinasas y catepsinas elastolíticas que destruyen el colágeno, adelgazando la cápsula con el consiguiente riesgo de ruptura. Además, existe un relativo déficit de CML en placas causantes de infarto agudo de miocardio. Es probable que mediadores inflamatorios locales provoquen la apoptosis de las CML, y al ser estas las encargadas de mantener y reparar la cápsula fibrosa, exista mayor riesgo de ruptura (5).

Las placas que han sufrido una ruptura fatal muestran una importante acumulación de macrófagos y lípidos. Un núcleo lipídico grande es más propenso a romperse. Desde el punto de vista metabólico existe mayor producción de citoquinas y enzimas que degradan la matriz. La capacidad de los fármacos hipolipemiantes de disminuir el número de infartos se debe, al menos en parte, a una reducción de la acumulación de lípidos en la placa, un efecto antiinflamatorio y una disminución de la trombogenicidad plaquetaria (22).

La ruptura de una placa aterosclerótica es un fenómeno complejo. La mayoría de rupturas de la placa no producen un síndrome coronario agudo. El estudio anatómo-patológico de corazones obtenidos de pacientes que han muerto por causa no cardiológica, muestran un alto número de rupturas focales de placa, con pequeños trombos locales. Lo mismo se observa en corazones extraídos tras trasplante por cardiopatía isquémica. Se considera que los ciclos repetidos de ruptura, trombosis in situ, y curación probablemente contribuyan a la progresión de la placa. Las plaquetas eliminan TGF- $\beta$  y PDGF, lo que promueve la curación del sitio donde se ha producido la trombosis, estimulando la migración de CML y la producción de colágeno (23).

En el pasado, estudios en placas que habían causado un evento trombótico fatal, introdujeron el concepto de “placa vulnerable” o de “riesgo alto” (5). La evidencia actual muestra que la inflamación que se pensaba caracterizaba la placa vulnerable es difusa. En un estudio realizado con resonancia magnética, evaluando placas carotideas de pacientes con un síndrome coronario agudo, se encontró que el 95% tenían signos inflamatorios (incremento >50% de la señal en T2 y/o captación de gadolinio), comparado con un 33% en pacientes control (24). Múltiples técnicas de imagen han encontrado una asociación entre las lesiones causantes de eventos con remodelado positivo o crecimiento compensador del vaso, radiolucencia y calcificaciones punteadas (5).

Múltiples estudios han mostrado que existe un aumento de marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva, en pacientes en riesgo de tener un síndrome coronario agudo, e incluso podrían estar implicados en la patogénesis de los eventos agudos (25). Al estudiar el transcriptoma plaquetario, lo que da una idea de los genes transcritos los días previos a un evento, se observa un incremento importante de la transcripción de proteínas implicadas en la inflamación (26). Estos hallazgos tienen implicaciones terapéuticas; además de las estrategias de revascularización local se debe actuar a nivel sistémico para estabilizar las placas y evitar eventos recurrentes.

#### 1.1.6. Clasificación de las lesiones ateroscleróticas

El comité de lesiones vasculares de la American Heart Association realizó una clasificación de las lesiones ateroscleróticas que es útil para valorar y entender la progresión de las mismas (27,28).

- **Tipo I (lesión inicial):** son los primeros depósitos lipídicos en la íntima y la reacción celular a dichos depósitos. Son más frecuentes en los niños, aunque también pueden aparecer en adultos, especialmente aquellos con escasa aterosclerosis o en zonas que son resistentes a la aterosclerosis. La acumulación de macrófagos y de células espumosas en la íntima arterial también es el cambio inicial en animales que se les induce hipercolesterolemia.

- **Tipo II:** incluyen las estrías grasas, que clásicamente se tiñen de rojo con Sudán III y Sudán IV. Cuando estas lesiones se asocian a engrosamiento intimal pueden no ser visibles como estrías grasas. Microscópicamente se caracterizan por presentar células espumosas estratificadas en diferentes capas, y ya se encuentran linfocitos T y algunos mastocitos aislados.
- **Tipo III (lesión intermedia):** se caracteriza por presentar lípidos extracelulares, ya sea recubiertos o libres de membranas, que alteran la estructura de la capa de CML.
- **Tipo IV (ateroma):** contiene un núcleo lipídico confluyente, que ocupa una región extensa pero bien definida de la íntima, que ocasiona una importante desorganización de su espacio extracelular. Suele ser una lesión excéntrica, al menos al inicio. La capa entre el núcleo lipídico y el endotelio es básicamente la íntima, de aspecto prácticamente normal. Esta lesión, aunque no suele producir obstrucción al flujo, es susceptible de fisurarse y convertirse en una lesión tipo VI.
- **Tipo V:** se caracterizan por contener capas gruesas de tejido conectivo fibroso. Estas lesiones también son propensas a fisurarse, lo que les confiere su importancia clínica.
  - **Tipo Va (fibroateroma):** contienen un núcleo lipídico importante.
  - **Tipo Vb:** lesiones con calcificación importante.
  - **Tipo Vc:** lesiones con predominio de tejido conectivo fibroso, con escasos lípidos y calcio. Son más frecuentes en miembros inferiores.
- **Tipo VI (lesión complicada):** placa complicada, puede ser:
  - **Tipo VIa:** con ruptura de la superficie.
  - **Tipo VIb:** hematoma o hemorragia.
  - **Tipo VIc:** trombosis.
  - Si presenta las tres características se cataloga como *tipo VIabc*.

En general las lesiones tipo IV y Va son las más susceptibles de complicarse. Las lesiones de los tipos IV, V y VI pueden causar dilatación o aneurismas del territorio vascular que ocupan.

### 1.1.7. Características de las placas ateroscleróticas de alto riesgo

Se han definido características de la placa aterosclerótica que se considera le confieren un mayor riesgo de ruptura (16). Estas son:

- Capa fibrosa fina (<65  $\mu\text{m}$ ).
- Bajo contenido de colágeno.
- Alta densidad de macrófagos.
- Escasas células musculares lisas.
- Núcleo necrótico grande, rico en lípidos.
- Microcalcificaciones punteadas.
- Neovascularización y presencia de hemorragia intraplaca.
- Remodelado excéntrico.

## 1.2. LA IMAGEN EN LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis subclínica se ha relacionado con un incremento del riesgo de padecer eventos cardiovasculares (29). Múltiples esfuerzos se van realizando desde hace muchos años para estudiar la aterosclerosis con el fin de determinar mejor el riesgo individualizado de las personas. Por un lado, se ha utilizado la imagen para poder caracterizar la placa aterosclerótica, y por otro para valorar la carga global en diferentes territorios, con la idea de que su afectación es fundamentalmente sistémica. Inicialmente, y en la actualidad en la práctica clínica, una de las principales formas de evaluar la presencia de aterosclerosis es valorando la presencia de estenosis en la luz arterial. La angiografía es el método tradicional para evaluar la luz vascular, pero no permite ver la pared del vaso, por lo que no permite identificar lesiones precoces o el volumen de la lesión. Además, las estenosis severas no son necesariamente las que producen los eventos agudos como el ictus o el infarto de miocardio. En los últimos años se han desarrollado varios métodos para estudiar mejor la aterosclerosis. Dado que la aterosclerosis es una enfermedad sistémica, no necesariamente se tienen que estudiar las arterias coronarias o cerebrales para determinar el riesgo de infarto o ictus (30,31).

### 1.2.1. Técnicas no invasivas

Se refiere a aquellos métodos en los que no se requiere acceso percutáneo para su valoración.

#### 1.2.1.1. Ecografía

Es uno de los métodos más utilizados para estudiar diferentes territorios vasculares, dado que se utiliza ultrasonidos, no tiene el efecto de la radiación ionizante, además de ser fácilmente accesible y de bajo coste. Por mucho tiempo se consideraron las arterias carótidas el lugar idóneo para realizar la ecografía (32), especialmente centrados en el estudio del grosor íntima-media (IMT [intima media thickness], por sus siglas en inglés) de la carótida común, que se correlacionó con envejecimiento vascular y la hipertensión, utilizándose como un marcador de riesgo de muerte cardiovascular (33). A pesar del uso que se le dio al IMT, tiene sus limitaciones, como por ejemplo que no permite evaluar lo que sucede distalmente a la bifurcación de la carótida, habiendo sido

cuestionada su utilidad para la individualización del riesgo cardiovascular (31). Han habido intentos de realizar una caracterización tisular con ecografía, permitiendo determinar los componentes de la placa en base a su contenido espectral específico, con técnicas de procesamiento de imágenes offline, que mejoran la pobre resolución espacial de la ecografía hasta 300  $\mu\text{m}$ . Comparada con la histología, la sensibilidad y especificidad para detectar trombos, contenido lipídico y tejido fibroso se encuentra entre 80-85% y 78-91%, respectivamente, siendo la precisión mayor cuando se trata de detectar regiones calcificadas (sensibilidad 89%, especificidad 91%) (34). Las mediciones de la placa aterosclerótica (grosor o área) por ecografía 2D han demostrado ser un mejor predictor de eventos cardiovasculares, pero son muy dependientes del operador, mostrando una alta variabilidad al medir el grosor de la placa, con diferencias medias absolutas entre 0.25 y 0.55 mm (coeficiente de variación entre 13.8% y 22.4%) (35), lo que limita la reproducibilidad de los resultados.

Recientemente se ha validado una nueva técnica de ecografía vascular 3D (3DVUS) utilizando una sonda que realiza un barrido automático interno, lo que permite obtener medidas volumétricas muy precisas, independientemente del tamaño de la placa; así mismo, simplifica la adquisición y disminuye la variabilidad interoperador (36). Además, la resolución que logra es alta, con una distancia entre *frames* de hasta 0.1 mm, Esta tecnología se ha utilizado para cuantificar la carga aterosclerótica en pacientes de mediana edad sin enfermedad cardiovascular conocida, demostrando su capacidad para determinar la carga aterosclerótica, especialmente a nivel femoral, con una buena correlación con los factores de riesgo cardiovascular clásicos (37).

#### **1.2.1.2. Ecografía con contraste**

La presencia de neovascularización dentro de la placa aterosclerótica se considera un marcador de inestabilidad y vulnerabilidad de la placa, especialmente cuando se trata de vasos irregulares, dismórficos, con células altamente inmaduras y ausencia de células musculares lisas. Estas placas se caracterizan por una alta permeabilidad, lo que permite el reclutamiento de células inflamatorias (38). El contraste ecográfico contiene microburbujas de

gases inertes, de un tamaño menor que la longitud de onda de los ultrasonidos, y bajo coeficiente de solubilidad en sangre; el uso de contraste, valorando el grado de ecogenicidad, puede servir para caracterizar la angiogénesis intraplaca, que no se relaciona con el grado de estenosis, incluso se considera que puede ser útil para cuantificar la inflamación de la placa con una correlación moderada, siendo la ecogenicidad de las placas mayor en pacientes sintomáticos (39).

### **1.2.1.3. Resonancia Magnética (RM)**

Permite medir la pared y la luz del vaso. En múltiples estudios se ha utilizado el área de la pared como equivalente de la carga aterosclerótica (40–43). También se utiliza la relación entre ambas, lo que se denomina el índice normalizado de la pared (NWI), que se calcula dividiendo el volumen de la pared entre la suma del volumen de la luz arterial con el volumen de la pared, permite estimar la carga aterosclerótica tomando en cuenta las diferencias en el área luminal y dándole más importancia a la carga aterosclerótica, lo que resulta especialmente importante en la aterosclerosis precoz, cuando el volumen de la pared no es tan elevado (42). La correlación entre las mediciones manuales de la resonancia y la histopatología se han descrito en 0.74 con el trazado manual y en 0.87 con un programa de medición semiautomático (43). Otros estudios han estudiado su capacidad para obtener información acerca del volumen y la composición de la placa en diferentes territorios arteriales, con la ventaja de no utilizar radiaciones ionizantes. Incluso con análisis espectral se puede discriminar el núcleo lipídico, la capa fibrosa, calcificaciones, hemorragia y trombos con valores de sensibilidad y especificidad entre 76-92% y 65-86% respectivamente (44). Estudios con resonancia magnética han mostrado que el uso de estatinas se asocia a un incremento del porcentaje del tejido fibroso en la placa (7.77; IC 95%: 2.4 a 13.14,  $p = 0.005$ ) y presenta una correlación negativa con la hemorragia intraplaca (OR = 0.34; IC 95%: 0.13 a 0.89,  $p = 0.028$ ) y con el porcentaje de núcleo lipídico (-7.91; IC 95%: -13.6 a -2.22,  $p = 0.007$ ) (45). Sin embargo, la técnica de RM arterial es compleja con tiempos de exploración muy prolongados, su interpretación requiere de una gran experiencia, su disponibilidad es limitada y el coste económico elevado.

#### **1.2.1.4. Resonancia magnética con contraste**

El contraste utilizado habitualmente es el gadolinio, asociado a un quelante, para convertirlo en un material biocompatible. El gadolinio es un metal raro, que tiene un tiempo T1 corto constante, que promueve la relajación de las moléculas de agua en su proximidad, lo que provoca un aumento de la intensidad de señal en las secuencias potenciadas en T1. Después de la inyección, el contraste se desplaza por el espacio vascular, posteriormente se mueve al espacio extravascular, estando más concentrado en lugares donde el espacio extravascular está aumentado, como son el tejido cicatricial o la cápsula fibrosa. El gadolinio se puede utilizar para mejorar la caracterización tisular, diferenciando la cápsula fibrosa del núcleo lipídico (coeficiente de correlación: 0.87) e identificar sitios de neoangiogénesis (coeficiente de correlación: 0.67), utilizando una secuencia especial combinando pre-pulsos de inversión de la recuperación y de supresión de flujo basado en difusión, una hora tras la administración de contraste (46).

#### **1.2.1.5. Tomografía axial computarizada (TAC)**

La tomografía computarizada multicorte utiliza una fuente de rayos-X rotacional capaz de obtener cortes de hasta 0.5 mm de grosor en un tiempo corto. La detección y cuantificación de aterosclerosis subclínica mediante TAC coronario por el método del Score de Calcio, se recomienda para la valoración del riesgo cardiovascular según las guías americanas y europeas (30,31). Análisis realizados de la cantidad de calcio presente en las arterias coronarias se han correlacionado con aterosclerosis coronaria y es un predictor de eventos cardiovasculares (47). La realización de TAC tras la administración de contraste iodado intravenoso, permite la realización de una angiografía coronaria no invasiva, en el tiempo que el paciente contiene la respiración. Se ha demostrado que pacientes que muestran placas en las arterias coronarias con remodelado excéntrico y baja atenuación tienen mayor riesgo de presentar un síndrome coronario agudo que aquellos que no tienen éstas características (48).

Estudios recientes han confirmado que la ausencia de calcio coronario predice una supervivencia libre de eventos cardiovasculares en pacientes de

bajo e intermedio riesgo CV por las escalas de riesgo tradicionales, con una incidencia menor del 1% de mortalidad cardiovascular a los 15 años (49). Sin embargo, la evidencia es controvertida en ciertos grupos poblacionales, como son los jóvenes y las mujeres (50,51). También se discute su utilidad para monitorizar los cambios en el perfil de riesgo cardiovascular en pacientes que reciben tratamiento con estatinas (52), habiéndose demostrado que el tratamiento incrementa la presencia de calcio intracoronario como efecto estabilizador de la aterosclerosis, disminuyendo el núcleo lipídico y aumentando la porción fibrocálcica. Por otra parte, su uso en la población general sana no es fácil de extender, al ser una técnica que utiliza radiaciones ionizantes, aunque sea a dosis bajas.

#### **1.2.1.6. Tomografía por emisión de positrones (PET)**

Permite detectar la actividad metabólica de un tejido midiendo los positrones emitidos por algunos isótopos, típicamente isótopos de glucosa unidos a una molécula trazadora. El trazador más utilizado es la <sup>18</sup>F-fluorodesoxiglucosa (<sup>18</sup>F-FDG). Después de su administración intravenosa es captado por transportadores de glucosa (GLUT 1 y 3) que lo llevan al interior de las células que metabolizan glucosa. En el citoplasma la <sup>18</sup>F-FDG es fosforilada por la hexoquinasa en <sup>18</sup>F-FDG-fosfato, que no puede ser glicosilada por carecer del grupo 2' hidroxil, permaneciendo atrapada dentro de la célula, acumulándose en función de la demanda de glucosa, por lo que actúa como un marcador de actividad metabólica (53). También se ha relacionado la captación de <sup>18</sup>F-FDG con niveles de marcadores inflamatorios; por ejemplo, los niveles circulantes de metaloproteinasa 1 de matriz, un marcador de aterosclerosis avanzada, en pacientes con estenosis carotídea (54). En la aterosclerosis se ha correlacionado con la presencia de macrófagos e inflamación (55,56).

Una de las limitaciones del PET es su resolución espacial (efecto de volumen parcial), por lo que se suele co-registrar con alguna otra técnica de imagen, usualmente de tomografía computarizada (PET-TC), lo que permite mostrar la distribución del radiotrazador en una reconstrucción 3D, con correcciones para atenuación, tiempo muerto y dispersión. Para cuantificar la

señal PET se seleccionan las regiones de interés (region of interest [ROI]) y se determinan los valores de la captación media y máxima normalizados por el peso y dosis de radiotrazador administrada (SUVmean y SUVmax), además se puede realizar una corrección con la actividad de fondo (tissue-to-background ratio, TBR).

Para la obtención de imágenes óptimas en el estudio de la aterosclerosis, se recomienda que el tiempo entre la administración de  $^{18}\text{F}$ -FDG y la obtención de las mismas sea entre 2 y 3 horas después de la administración del trazador (mayor que en casos de neoplasias). Esto permite que una cantidad suficiente del trazador se acumule en la pared arterial y los niveles de fondo decaigan, siendo un marcador subrogado de la actividad metabólica. También es importante conocer los niveles de glucemia previos a la realización del PET, ya que la hiperglucemia, así sea moderada, puede disminuir la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG por las células de la placa (57).

En 2001 se demostró, con una sonda para detectar positrones, en un modelo de aterosclerosis de conejo (lesión con catéter de Fogarty y 3 semanas de dieta hipercolesterolémica), comparando *ex-vivo* segmentos de la arteria iliaca lesionada, con segmentos de la arteria que no había recibido denudación endotelial, presentaban mayor captación  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $p < 0.001$ ). En el estudio histopatológico se vio que los segmentos lesionados tenían un grosor mayor de las capas íntima y media de la arteria, así como más macrófagos y células musculares lisas; mostrando correlación entre la cuenta de positrones y el ratio íntima-media ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.03$ ) (58).

Tawakol y colaboradores (59) publicaron en 2005 un estudio utilizando un modelo de aterosclerosis de conejo (dieta hipercolesterolémica durante 6 meses y denudación endotelial aórtica), en el que describen que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG es significativamente mayor en los conejos con aterosclerosis que en los controles ( $p < 0.001$ ). En el análisis *ex-vivo* con un contador gamma, describen una correlación significativa entre la actividad de  $^{18}\text{F}$ -FDG y la densidad de macrófagos valorada con la tinción de RAM-11 ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.0001$ ), sin que exista correlación con la tinción para músculo liso ( $r = -0.03$ ,  $p = 0.98$ ), el grosor de la pared arterial ( $r = 0.27$ ,  $p = 0.37$ ) o el grosor de la

placa ( $r = -0.24$ ,  $p = 0.42$ ). En el análisis *in-vivo* encontraron con el PET una buena correlación entre la captación y la tinción con RAM-11, muy significativa al analizar en conjunto con los controles ( $r = 0.93$ ,  $p < 0.0001$ ) y algo menor, pero también significativa al analizar sólo segmentos con aterosclerosis ( $r = 0.73$ ,  $p < 0.002$ ). Como limitaciones cabe destacar que no describen el número de cortes histológicos analizados por segmento, y la co-localización con tomografía sólo la realizan en 2 conejos.

La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG depende muy poco del flujo sanguíneo, especialmente cuando la obtención de imágenes es tardía ( $>2$  horas). Por ejemplo, el miocardio isquémico, severamente hipoperfundido, es hipercaptante; la respuesta celular al bajo flujo y la hipoxia parecen ser los responsables de estos cambios en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG (57). En un estudio por Folco y colaboradores se demostró que la hipoxia, mas no las citoquinas proinflamatorias, estimulan potentemente la captación de glucosa por los macrófagos y las células espumosas. Estudios inmunohistoquímicos en placas humanas muestran una expresión abundante de proteínas que regulan la utilización de glucosa, especialmente en zonas de las placas ricas en macrófagos que previamente estuvieron hipóxicas. Las células endoteliales y las células musculares lisas también incrementan su captación de glucosa cuando están expuestas a citoquinas proinflamatorias, por lo que concluyen que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG puede reflejar más macrófagos estimulados por hipoxia que el grado de inflamación (60). Mateo y colaboradores, utilizando un modelo de aterosclerosis en conejo, el incremento progresivo de la captación de  $^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazol ( $^{18}\text{F}$ -FMISO), un radiotrazador para detectar hipoxia, sin incrementos significativos en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG (61); además, encontraron que la presencia de macrófagos determinada con la tinción RAM-11, era mayor en las zonas hipóxicas.

El primer estudio clínico usando PET-TC que analizó placas de ateroma *in vivo* se realizó en 8 pacientes con aterosclerosis carotídea sintomática (tiempo medio entre los síntomas y la realización del PET-TC: 3.5 meses), encontrándose que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, 3 horas después de su administración, era 27% mayor en el lado sintomático que en el lado

contralateral (6 pacientes tenían placas bilaterales). No existía captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en las carótidas contralaterales de los dos pacientes que no mostraban aterosclerosis en dicha zona. Se realizó endarterectomía carotídea a los 8 pacientes (tiempo medio hasta la intervención, 43 días). La autoradiografía de las placas extirpadas de tres de los pacientes confirmó la acumulación de deoxiglucosa en áreas de la placa ricas en macrófagos (62).

En un estudio con 17 pacientes, se les hizo un PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG en el mes previo a la realización de una endarterectomía carotídea. Se calculó la proporción de actividad placa/sangre (target to background ratio, TBR), demostrándose que existe una correlación entre la señal del PET y la tinción de macrófagos con anti-CD68 ( $r = 0.85$ ;  $p < 0.0001$ ). La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG no se correlacionó con el área o el grosor de la placa, ni con el área de músculo liso (63). Zhao y colaboradores realizaron un estudio para monitorizar la evolución del estado inflamatorio de la aorta en un modelo de aterosclerosis de conejo con PET-TC con  $^{18}\text{F}$ -FDG, comparando dos grupos, uno de los cuales recibía estatinas. Se midió el valor de captación estandarizado máximo (SUVmax) y el medio (SUVmean), posteriormente utilizaron inductores farmacológicos de trombosis a la semana 18, la captación era mayor en los conejos que hicieron trombosis, y ésta a su vez era mayor en el grupo sin estatinas, por lo que consideran que el PET-TC se puede utilizar para predecir eventos en pacientes con enfermedad aterosclerótica (64). Aunque esto resulta difícil de extrapolar a la utilidad que pueda tener en personas asintomáticas, dado que la mayoría de estudios se han realizado en pacientes que ya han tenido eventos (57).

El grado de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG se ha correlacionado con un gran número de factores de riesgo cardiovascular (65), así como con la escala de riesgo de Framingham, la edad, marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, MMPs y adiponectina) y expresión genética de marcadores de glicólisis e inflamación (como GLUT1, hexoquinasa tipo 2, CD68, catepsina K, MMP-9 e IL-18). En las carótidas, una captación incrementada de  $^{18}\text{F}$ -FDG se relaciona con características anatómicas de riesgo de la placa. También se relaciona con

un incremento de la rigidez de la aorta determinada por la velocidad de pulso, un importante indicador pronóstico de eventos cardiovasculares (57).

La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG típicamente no está en el mismo lugar que las microcalcificaciones vistas en la TC, lo que sugiere que la inflamación y la calcificación se producen en diferentes etapas de la aterosclerosis (66). En el estudio de Fernández-Friera y colaboradores (65) describen que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG es coincidente sólo con el 11% de las placas, la mayoría de las captaciones (61.5%) se producen en zonas libres de aterosclerosis, sugiriendo que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG se anticipa a la presencia de aterosclerosis detectable por resonancia. Se ha utilizado el PET para evaluar la respuesta a diferentes tratamientos para la aterosclerosis, por ejemplo, en un estudio en que comparaban las dosis de 5 y de 20 mg de atorvastatina en pacientes con dislipidemia, en los pacientes con la dosis de 20 mg, tras 6 meses de tratamiento, se observó una reducción del 7.9% ( $p = 0.007$ ) en la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG (TBR) en la aorta ascendente y del 9.9% ( $p = 0.012$ ) en la arteria femoral, siendo la reducción no significativa en los pacientes que recibieron la dosis de 5 mg de atorvastatina (67).

El uso del PET  $^{18}\text{F}$ -FDG en la valoración del riesgo CV como estrategia de prevención primaria se limita a estudios de investigación, al igual que la RM, por su complejidad, su escasa disponibilidad y, además, por ser una técnica que administra una dosis de radiación nada despreciable y lo hace a nivel sistémico, la dosis aproximada de un estudio, utilizando un protocolo de baja radiación, es de 8.5 mSv (68).

## **1.2.2. Técnicas invasivas**

### **1.2.2.1. Angiografía**

Es la técnica básica de elección para la valoración de las estenosis arteriales, especialmente de las coronarias; en general permite valorar el grado de estenosis y de forma cualitativa la presencia de calcificaciones, pero no permite estudiar exhaustivamente las características de la placa aterosclerótica, ni tampoco predecir la evolución de las mismas (69).

### **1.2.2.2. Tomografía de coherencia óptica (OCT) intravascular**

La OCT es una técnica de imagen intravascular con gran resolución (10-20  $\mu\text{m}$ ). Permite determinar múltiples características morfológicas de la placa aterosclerótica de manera muy precisa, como son el área y el diámetro mínimos, el porcentaje de estenosis, la longitud de la lesión y el índice de excentricidad, también se ha utilizado para medir el grosor de la capa fibrosa e identificar zonas de erosión endotelial. De manera cualitativa también permite identificar los componentes de la placa con una sensibilidad y especificidad que va de 71% a 79% y 97 a 98% para placas fibrosas, 95% a 96% y 97% para placas fibrocalcificadas, y 90% a 94% y 90% a 92% respectivamente para placas con un núcleo rico en lípidos (70).

La OCT también se ha utilizado para determinar la presencia y cantidad de diferentes tipos de células presentes en la placa lipídica, especialmente macrófagos; en un estudio realizado en 26 placas ateroscleróticas obtenidas de aorta y bulbo carotideo de cadáveres (dentro de 72 horas tras la muerte), comparando OCT con histología (tinción CD68) se vio una alta correlación en la densidad de macrófagos en la cápsula fibrosa ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.0001$ ) (71). La importancia en determinar la presencia de macrófagos en la placa aterosclerótica radica en que se ha descrito que placas ateroscleróticas de pacientes que han tenido angina inestable o infarto no Q tienen un mayor porcentaje de macrófagos que aquellas de pacientes con angina crónica estable,  $13.3 \pm 5.6\%$ ,  $14.6 \pm 4.6\%$  versus  $3.14 \pm 1\%$  respectivamente (72).

### **1.2.2.3. Ecografía intravascular (IVUS)**

El IVUS es otra técnica de imagen intravascular, con menor resolución que la OCT (100-200  $\mu\text{m}$ ), pero que no requiere la administración de contraste para la obtención de las imágenes. Utiliza ultrasonidos para la obtención de las imágenes, que se puede realizar de forma manual, o con desplazamiento automático utilizando un sistema mecánico, lo que permite realizar mediciones de longitud y volumen de placa. Es el método más sensible para valorar la presencia de calcificaciones coronarias (73). Aunque las imágenes generadas no se pueden utilizar para realizar determinar el contenido histológico de la placa, se puede hacer un análisis cualitativo, diferenciando placas blandas,

que suelen tener alto contenido de lípidos; fibrosas, con una ecogenicidad intermedia, que representan la mayoría de las placas; calcificadas, o mixtas; así como la presencia de trombo, que se observa como una masa intraluminal, con una apariencia lobulada, en capas o con pedúnculo (74). No existen características en el IVUS que definan la presencia de una placa como vulnerable (75), las placas rotas tienen apariencias muy variadas en el IVUS, pudiendo observar ulceración o ruptura de la placa.

### **1.2.3. Retos actuales en la imagen de la placa aterosclerótica**

Identificar lesiones ateroscleróticas de manera precoz se está convirtiendo en un objetivo para poder estratificar mejor el riesgo cardiovascular, especialmente en pacientes asintomáticos (2). Hemos descrito previamente lo prolongada que resulta la etapa preclínica de la aterosclerosis, detectándose recién en una etapa tardía, cuando ya se presenta un evento clínico, que en muchas ocasiones es fatal. Existe claramente la necesidad de diagnosticar esta enfermedad de manera precoz y poder aplicar estrategias de prevención y tratamiento dirigidas. Los factores de riesgo clásicos y las escalas de riesgo ayudan en este sentido, pero sus limitaciones son ampliamente reconocidas, especialmente en grupos considerados de bajo riesgo como mujeres y jóvenes (50,51). La evaluación no invasiva de la carga aterosclerótica en pacientes de mediana edad potencialmente puede mejorar la valoración del riesgo cardiovascular y determinar estrategias de prevención más efectivas. Existen algunos estudios en marcha, como el estudio PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis), diseñados para evaluar la presencia de aterosclerosis en carótidas, aorta, coronarias y territorio íleo-femoral, con diferentes técnicas no invasivas en pacientes asintomáticos de mediana edad (76). El uso de técnicas de imagen no invasivas tiene mucho potencial para el estudio de la aterosclerosis en pacientes asintomáticos.

Determinar la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica *in vivo* es otro de los grandes objetivos de la imagen, aunque aún queda por definir la correlación real entre las diferentes técnicas y el riesgo real de los pacientes de presentar un evento isquémico. Además, no existen estudios que comparen las diferentes técnicas utilizadas entre ellas ni la correlación que existe con

hallazgos histológicos con el objetivo de determinar una asignación más eficiente de los test de imagen para el screening de la enfermedad. Con la evidencia que tenemos hasta el momento no está recomendado en las guías el cribado sistemático con imagen multimodal para la predicción de eventos cardiovasculares (77,78), aunque sí se contempla, incluso se recomienda, la utilización del score de calcio coronario como modificador del riesgo en la evaluación de personas con riesgo intermedio calculado con las escalas convencionales (77).

### 1.3. MODELOS DE ATEROSCLEROSIS EN ANIMALES

El desarrollo de modelos animales de las diferentes patologías cardiovasculares, y en específico de la enfermedad aterosclerótica ha permitido tener mayores conocimientos de la fisiopatología, y son esenciales para evaluar nuevas tecnologías y nuevos tratamientos. En este apartado presentamos los principales modelos que existen en relación con la aterosclerosis, y especialmente el modelo desarrollado en conejo.

	Ventajas	Desventajas
<b>Ratón</b>	Rápido desarrollo de placas ateroscleróticas	Semejanza parcial con los humanos
	Útil para imagen no invasiva (RM, PET, CT, US)	Sirve como modelo más de aterosclerosis que de aterotrombosis
	Relativa facilidad para manipular el genoma	Niveles lipídicos muy altos en sangre
	Genoma conocido	
	Camadas grandes	
	Relativamente barato	
	Ciclo reproductivo corto	
Amplia experiencia		
<b>Rata</b>	Fácil, disponible y barato Útil para estudio de reestenosis	No desarrollan placa de ateroma
<b>Conejo</b>	Tamaño mediano	Necesita niveles sanguíneos de colesterol altos
	Lesiones de fibroateroma	No sirve para ruptura de placa
	Modelo útil para reestenosis	Es un modelo más de formación de neoíntima que de aterosclerosis
	Asequible	

Porcino	Lesiones similares a las humanas	Costo elevado
	Útil para estudio de reestenosis	Difícil de manejar
		Pocas herramientas genómicas

**Tabla 1: Ventajas y desventajas de los diferentes modelos animales de aterosclerosis**

Modificada de: Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, y colaboradores *Animal models of cardiovascular diseases*. J Biomed Biotechnol (79).

### 1.3.1. Modelos en ratones

Estos modelos son útiles para el estudio del desarrollo y la progresión de lesiones ateroscleróticas, especialmente los ratones *knockout* y transgénicos que han permitido entender los mecanismos moleculares y celulares envueltos en la aterogénesis, así como evaluar la efectividad de los diferentes tratamientos antiateroscleróticos (80). Dado que los ratones en general son resistentes al desarrollo de lesiones ateroscleróticas, los modelos actuales se basan en modificaciones genéticas de lipoproteínas del metabolismo asociados a cambios de dieta. Dentro de ellos, el ratón con ausencia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR *-/-*) y el ratón con ausencia de apolipoproteína E (apoE *-/-*) son los más utilizados, especialmente este último. Las lesiones que se producen en estos ratones se pueden incrementar añadiendo otros factores de riesgo como la hipertensión y diabetes (79). Existen diferencias importantes entre los ratones y los humanos que se deben mantener en mente al analizar los resultados; por ejemplo, el número de plaquetas en los roedores es 4 veces mayor que en los humanos y el tamaño de éstas es aproximadamente la mitad de las plaquetas humanas (81), es por ello que no resulta un buen modelo para estudio de fármacos antitrombóticos.

### 1.3.2. Modelos en conejos

En 1913 se describió que el colesterol causa cambios ateroscleróticos en la íntima arterial de los conejos, los cuales son similares a la aterosclerosis

humana. La administración de dieta hipercolesterolémica genera la formación de placas ateroscleróticas, que progresan a pesar de la suspensión de la dieta, y cuya producción se acelera con la administración intermitente de dieta rica en colesterol (82). También se pueden desarrollar lesiones ateroscleróticas en conejos con colesterol normal denudando la pared endotelial de las arterias (79). La mayoría de estudios realizados en la actualidad con el modelo de conejo utilizan ambas estrategias, lo que produce lesiones más avanzadas en menos tiempo. Las placas ateroscleróticas que se logran, se parecen, al menos en parte, a las placas humanas, principalmente en lo que se refiere al componente inflamatorio. Este modelo se ha utilizado ampliamente para estudiar el efecto de diferentes tratamientos que modifican la formación de la placa y su estabilización, estudios que han contribuido a conocer mejor diferentes aspectos de la inflamación en el ateroma (83,84).

Por ejemplo, en el estudio realizado por Borja Ibáñez y colaboradores (40), que trabajó con un equipo con amplia experiencia en este modelo, utilizaban conejos machos de la raza New Zealand White, alimentándolos con una dieta de colesterol al 0.2% durante nueve meses, se realizaban 2 denudaciones endoteliales aórticas, en las semanas 1 y 12 de iniciada la dieta hipercolesterolémica. Previo a las denudaciones se anestesian los conejos con ketamina y xilasina intramuscular. Las denudaciones se realizaban bajo guía fluoroscópica con catéteres Fogarty de 3-4 F. El catéter se introduce por la arteria femoral, la cual se tiene que disecar con cuidado por el riesgo de lesionar el nervio femoral. Se progresa el catéter hasta la aorta torácica descendente, se infla el balón y se tracciona hasta llegar a la bifurcación iliaca; la denudación se repite en 3 ocasiones. Posteriormente se liga la arteria femoral, que no suele ocasionar complicaciones dado que la circulación en miembros inferiores tiene una adecuada red de colaterales.

En 2001, Helft y colaboradores (85) estudiaron la placa aterosclerótica en este modelo con resonancia magnética. Utilizaron la secuencia de *fast-spin echo* con una resolución de 350 por 350 micras y un grosor de corte de 3 mm. Describen una correlación altamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre el grosor medio de la pared y el área de la pared del vaso con la histopatología ( $r = 0.87$

y  $r = 0.85$ , respectivamente). También encontraron una correlación significativa respecto a la composición de la placa ( $p < 0.05$ ), al analizar su componente fibroso y lipídico, analizando las imágenes potenciadas en T2.

### 1.3.3. Modelos en cerdos

El cerdo es un buen modelo de aterotrombosis debido a que puede desarrollar lesiones ateroscleróticas de manera espontánea, la anatomía cardiovascular se parece a la humana y permite evaluar las arterias coronarias en lugar de vasos centrales como sucede con animales más pequeños (81). La aterosclerosis en cerdos se desarrolla lentamente, ya sea espontáneamente (con comida regular) o inducida experimentalmente (dieta aterogénica), su ubicación y desarrollo es similar a la aterosclerosis de los humanos, tanto en composición como en distribución, incluso se logra la formación de circulación colateral en caso de oclusión arterial progresiva con el uso de ameorides (86,87). Con la dieta hipercolesterolémica los cerdos alcanzan niveles de colesterol en sangre similares a los humanos, desarrollando lesiones ateroscleróticas tempranas a los 50 días (estrías grasas) en la aorta abdominal, y en menor medida en las arterias coronarias (88). El desarrollo de lesiones más avanzadas incluye tiempos más prolongados de desarrollo del modelo, con el consiguiente problema de manejo de cerdos de mayor tamaño; esto se ha logrado solventar en los últimos años con el uso de *minipigs*, aunque éstos son más caros y requieren un manejo específico (81).

#### 1.4. EL CONCEPTO DE LA PLACA VULNERABLE

Estudios de anatomía patológica han demostrado la asociación entre el infarto agudo de miocardio y la ruptura de una placa aterosclerótica, especialmente fibroateromas de pared delgada, que se caracterizan por tener un núcleo lipídico o necrótico separado de la luz de la arteria por una cápsula fina (89). Los mecanismos que llevan a las consecuencias clínicas de la aterosclerosis son más complejos de lo que se asumía inicialmente (90). Además de la presencia, extensión y actividad metabólica de la aterosclerosis, resultan críticas la adaptación individual y la respuesta trombogénica del individuo (91). Se han realizado múltiples estudios con diferentes técnicas de imagen para intentar determinar la presencia de placas ateroscleróticas vulnerables, dejando fuera gran parte de la complejidad de la enfermedad (91). Por ejemplo, en el estudio PROSPECT (Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree), se investigó las tasas de eventos adversos cardiovasculares en casi 700 pacientes a los que se les había realizado histología virtual con IVUS, determinando que el riesgo de infarto de miocardio o muerte súbita cardíaca en relación con lesiones “vulnerables” era muy bajo, sin diferencias con aquellos que presentan engrosamiento intimal (92). Se han realizado múltiples estudios que concluyen determinando la placa como un factor de riesgo independiente, pero tienen la limitación de no considerar la carga total de placa como un factor de confusión (91).

Un punto muy importante que hay que tener en cuenta es que muchas (si no la mayoría) de las rupturas de placa ocurren sin un síndrome clínico asociado. El porcentaje de pacientes que presentan rupturas subclínicas de la placa varía según el perfil de riesgo y el método de evaluación, con un rango que va del 4% al 79% (91). Muchos estudios longitudinales con imagen han demostrado que la morfología de las placas ateroscleróticas se modifica con el tiempo, ganando y perdiendo las características de vulnerabilidad (93,94). Cierta volumen de placa parece necesario para desencadenar una trombosis vascular; sin embargo, la falta de beneficio de implantar stents, así como el gran número de lesiones obstructivas encontradas en autopsias de personas sin síntomas de síndrome coronario agudo, lleva a considerar que el grado de

estenosis no altera el riesgo por encima de un determinado nivel. La enfermedad coronaria obstructiva y la no obstructiva se asocian con un riesgo similar de infarto de miocardio y muerte si la afectación de la primera es en un mayor número de segmentos coronarios (95).

Se necesita entender mejor que combinación de información entre la imagen y los factores de riesgo cardiovascular clásicos permite una mejor valoración individual del riesgo; además, se necesita entender los mecanismos que influyen al sistema de coagulación para producir las diferentes respuestas observadas frente a la ruptura de la placa.

### 1.5. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Como se ha ido describiendo existen múltiples formas de evaluar la aterosclerosis a través de la imagen, dada la necesidad de encontrar un método más fiable para determinar el riesgo individual de las personas de presentar un evento isquémico agudo. Los métodos actuales para valorar el riesgo cardiovascular aún son imperfectos, sin que exista un acuerdo general en cuál es la estrategia óptima, ni el punto de corte idóneo para iniciar tratamiento en pacientes asintomáticos (96). Se ha demostrado que la enfermedad aterosclerótica es un continuo, en el que la presencia de aterosclerosis, aunque no sea obstructiva, representa un mayor riesgo de eventos isquémicos (97).

Las pruebas de imagen se han ido evaluando de manera individual y describiendo su aportación en el estudio de la placa aterosclerótica, pero hasta ahora no se ha realizado una comparación *ad hoc* entre ellas, estudio que puede resultar complicado a nivel clínico, dada la limitada disponibilidad de algunas de las técnicas, ya sea por los costes, o el tiempo de exposición necesario, y en algunos casos, por la limitación para indicar un procedimiento invasivo o el uso de radiaciones ionizantes que implicaría. Por lo que consideramos la utilización de diferentes técnicas de forma simultánea para determinar su contribución en detectar la enfermedad en sus estadios precoces, así como en predecir la progresión de la enfermedad aterosclerótica en un modelo de conejo es de gran utilidad. Así mismo, un estudio extenso del

modelo permite describirlo de manera más detallada y sirve de base para el análisis de futuros estudios que se realicen a nivel preclínico.

## 2. HIPÓTESIS

---

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria progresiva. La ecografía vascular 3D y la resonancia magnética pueden ser útiles para la detección y cuantificación de la carga de la aterosclerosis precoz. Así mismo, el PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG, que permite evaluar la actividad metabólica de la placa, podría ser de utilidad para predecir la progresión de la aterosclerosis.

Así este estudio está basado en dos hipótesis principales. La primera es que la detección y cuantificación de la carga de aterosclerosis precoz es más precisa con ecografía vascular 3D comparada con la resonancia magnética. Como segunda hipótesis, predecir la progresión de la carga de enfermedad cuantificada con ecografía 3D y resonancia magnética es posible mediante la evaluación de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG con PET.

### 3. OBJETIVOS

---

El objetivo del estudio es valorar la capacidad de la ecografía vascular tridimensional y la resonancia magnética de detectar la presencia y las características anatómicas de la placa aterosclerótica precoz, comparadas con la histología, y correlacionar los hallazgos de ambas técnicas. Así mismo, se correlacionará la actividad metabólica determinada por la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, con los hallazgos anatómicos e histológicos y se valorará su utilidad en predecir la progresión de la enfermedad aterosclerótica en el modelo de conejo.

Para cumplir este propósito establecimos los siguientes objetivos concretos:

1. Comparar de forma seriada la presencia y los cambios en la aterosclerosis precoz en territorio de aorta abdominal de conejo, con ecografía vascular tridimensional y resonancia magnética.
2. Determinar la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en aorta abdominal evaluada por PET en conejos con dieta rica en grasa comparada con conejos control.
3. Correlacionar la actividad metabólica determinada por la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG con la presencia y carga de la aterosclerosis en la aorta de conejo determinadas por ecografía vascular tridimensional, resonancia e histología.
4. Determinar la utilidad de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en predecir la progresión de la enfermedad aterosclerótica en el modelo de conejo medida con ecografía vascular tridimensional y resonancia magnética.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

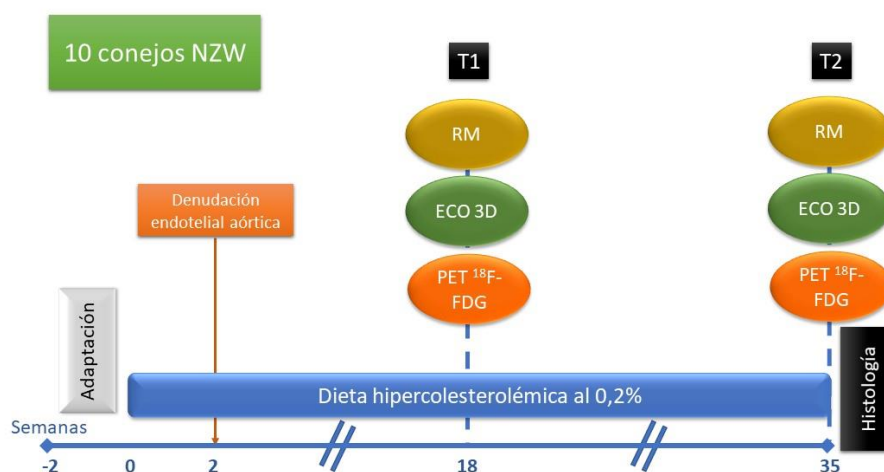
Los procedimientos realizados se incluyeron dentro de un proyecto aprobado por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM ES28079000176) para testar la eficacia de un nuevo fármaco frente a la aterosclerosis cuyo investigador principal es el Dr. Borja Ibáñez. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), donde se cuenta con la infraestructura y los equipos necesarios para la realización del proyecto, previa autorización del proyecto por el comité ético para la realización de estudios con animales, siguiendo la directiva europea 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013.

El diseño del estudio se resume en la Figura 3. La aterosclerosis experimental se indujo en 10 conejos machos de la raza “New Zealand White” (Charles Riber Laboratories, L'arbresle Cedex, France). Los animales, que a su llegada al centro tenían pesos entre 1000 y 1250 gramos, recibieron dieta estándar específica para conejos (LabDiet 5321, TestDiet®, Londres, Reino Unido) durante 2 semanas para lograr su adaptación al nuevo entorno y descartar la presencia de patologías previas; posteriormente se inició la dieta hipercolesterolémica (LabDiet 5321 [86,8%] con 0.2% de colesterol y 13% de mantequilla de cocoa, TestDiet®, Londres, Reino Unido), administrada *ad libitum*, que se mantuvo durante el resto del estudio. Entre 2 y 3 semanas ( $2.66 \pm 0,24$  semanas, promedio  $\pm$  desviación estándar) después de iniciar la dieta hipercolesterolémica, teniendo los conejos un peso promedio de  $3,06 \pm 0,47$  kg, se procedió a realizar la denudación endotelial de la aorta abdominal con catéter Fogarty (posteriormente se describe el procedimiento en detalle). La mortalidad durante el estudio fue del 20%, un conejo murió en relación con complicaciones del procedimiento de denudación y otro en relación a daño hepático por una respuesta exagerada a la dieta rica en colesterol, mortalidad similar a lo descrito en estudios previos (40).

Dieciocho semanas tras el inicio de la dieta hipercolesterolémica ( $18.8 \pm 1.0$  semanas), se realizó RM, ecografía vascular 3D y PET/TAC con  $^{18}\text{F}$ -FDG de la aorta abdominal, tomando como centro de referencia la arteria renal derecha, determinando las características morfológicas y funcionales de la placa, así como análisis de colesterol y marcadores inflamatorios. En torno a las 35 semanas de iniciada la dieta ( $16.3 \pm 1.2$  semanas después de las primeras pruebas de imagen) se repitieron la RM, la ecografía 3D y el PET/TAC, pasando posteriormente al sacrificio de los animales, previa inyección de heparina sódica, para la extracción de la porción de aorta estudiada e incluirla en formalina al 10% para realizar el estudio histológico.

Se utilizaron 4 conejos NZW con dieta estándar, con pesos entre 4 y 4.5 kg, para la realización de resonancia magnética de aorta abdominal como control y se utilizaron los datos históricos de 5 conejos NZW con pesos entre 3 y 3.5 kg, a los que se les realizó PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG, con un protocolo igual al utilizado en este estudio, como control.

## DISEÑO DEL ESTUDIO



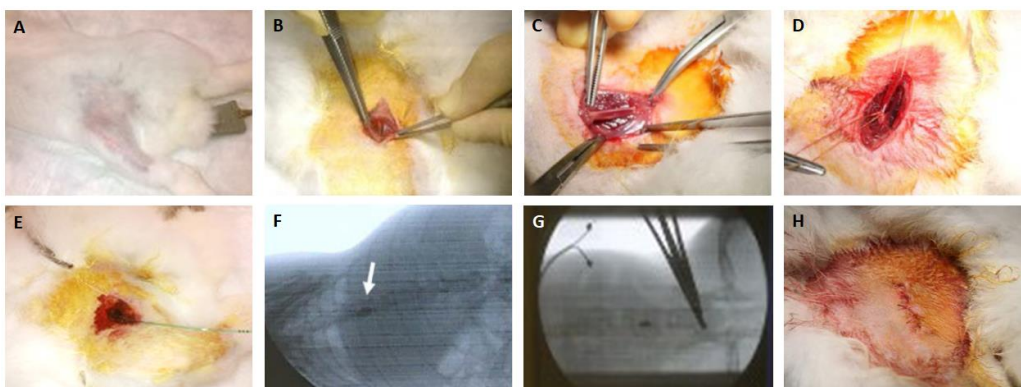
**Figura 3: Diseño del estudio**

### 4.2. DETALLE DE LOS MÉTODOS

#### 4.2.1. Denudación endotelial de aorta

Se realizó la denudación endotelial aórtica según lo descrito en estudios previos (40,98). Se anestesiaron los conejos con ketamina 20 mg/kg y xilacina

10 mg/kg, intramuscular. Además, se administró buprenorfina a 0.05 mg/kg vía intramuscular como analgésico. Se colocó pomada ocular tras la anestesia para prevenir el daño corneal. Posteriormente se colocó en la región femoral 5 mg de bupivacaina como anestésico local. El procedimiento se realizó mediante disección quirúrgica para localizar la arteria femoral derecha, teniendo especial cuidado de no dañar el nervio femoral. Se introdujo un catéter de embolectomía tipo Fogarty de 3 – 4 F (Edwards Lifesciences, Irvine, CA, Estados Unidos) que se progresó hasta el tercio medio de aorta torácica descendente bajo guía fluoroscópica. Se insufló el balón con contraste iodado para documentar adecuadamente la posición del balón. Se realizó una retirada cuidadosa con el objeto de denudar la íntima de la aorta sin producir mayor daño. Se denudó la aorta abdominal desde el nivel del diafragma hasta antes de la bifurcación en las arterias ilíacas. El procedimiento de retirada se repitió en 3 oportunidades. Posteriormente se retiró el catéter y se procedió a ligar completamente la arteria femoral, suturando posteriormente la piel con una sutura reabsorbible (Figura 4). Esta ligadura no provoca isquemia en el miembro inferior, ya que los conejos tienen un sistema de circulación colateral muy desarrollado (99).



**Figura 4: Procedimiento de denudación arterial con balón**

*A, zona inguinal derecha preparada para la cirugía. B, disección por planos. C, en el plano profundo del triángulo femoral se localizan la arteria y vena femoral envueltas en la vaina femoral y el nervio femoral por fuera de ésta. D, se aísla la arteria femoral, ligando su porción distal y colocando una sutura a nivel proximal. E, se introduce el catéter Fogarty en la arteria femoral y se avanza de forma retrógrada hasta el diafragma. F, globo inflado con contraste, localizado justo por debajo del diafragma (flecha blanca). G, se retrae el catéter con el balón inflado hasta antes de la bifurcación ilíaca. H, tras retirar el catéter se procede a la ligadura de la porción proximal de la arteria femoral y a la sutura de la herida quirúrgica.*

#### 4.2.2. Ecografía vascular

Los conejos fueron sedados con una combinación de ketamina (10 mg/kg IM) y xilacina (2.5 mg/kg). Se colocaron en una mesa de exploración en decúbito supino, con el abdomen afeitado (Figura 5). La obtención de imágenes se realizó con un equipo de ultrasonidos iU22 (Philips Health Care, Andover, MA, Estados Unidos). Para la ecografía vascular 3D se utilizó un transductor lineal-volumétrico VL13-5 3D (Philips Health Care, Andover, MA, Estados Unidos), que cuenta con un mecanismo interno mecánico que permite obtener datos volumétricos 3D cuantificables. Manteniendo una posición fija el transductor realiza un barrido automático con una velocidad angular constante.

El transductor opera con una amplia variedad rangos de frecuencias (de 5 a



**Figura 5: Preparación del conejo para la ecografía vascular 3D (Cortesía de B. López)**

13 MHz), y la distancia entre cuadros se controla ajustando el ángulo de barrido de 10 a 30°, para obtener distancias entre cuadros entre 0.1 y 0.3 mm. La longitud del vaso estudiado depende del ángulo elegido. En nuestro protocolo de adquisición utilizamos un ángulo de 30°, lo que da una longitud de escaneado de unos 6 cm, centrando el transductor en la

arteria renal derecha, paralelo al eje longitudinal de la aorta. El barrido incluyó el origen de ambas arterias renales.

El análisis de las imágenes se realizó posteriormente utilizando la aplicación de cuantificación de placa vascular (Vascular Plaque Quantification, VPQ) del QLAB 10.2 (Philips Health Care, Andover, MA, Estados Unidos). Esta aplicación detecta los bordes interno y externo de la pared del vaso y los límites de las placas ateroscleróticas, permitiendo calcular el volumen de placa. Para analizar las placas se utilizó una herramienta semiautomática que requiere se delinee el borde interno y externo de la pared del vaso en los cortes inicial y

final, así como algunos cortes intermedios, y el programa automáticamente extrapola los contornos a lo largo del vaso, posteriormente se corrige manualmente los contornos, especialmente en zonas con artefactos o donde la ventana acústica es deficiente. Este software limita su cuantificación al volumen de placa sin incluir las regiones de pared sanas. Tras la visualización completa de los 6 cm de arteria renal adquiridos, se identificaron las placas de aterosclerosis procediéndose a estimar su volumen. El volumen global de aterosclerosis se definió como la suma de los volúmenes de todas las placas visualizadas en la adquisición.

#### 4.2.3. Resonancia Magnética

Las medidas de la aorta abdominal se realizaron mediante RM de alta resolución. Las imágenes fueron obtenidas en un equipo de RM de 3 Teslas (Philips Health Care, Andover, MA, Estados Unidos; Figura 6). Los animales fueron sedados con una combinación de ketamina (10 mg/kg IM) y xilacina (2.5



**Figura 6: Preparación del conejo para la resonancia**

*Se coloca el conejo en decúbito prono en un coil de rodilla para la realización de la RM.*

mg/kg), manteniendo la anestesia durante la resonancia con isoflurano (1.2-1.5%) a través de una máscara ambiental. Los conejos se pusieron en decúbito prono en un coil de rodilla, que es de un tamaño adecuado para el abdomen del conejo. De manera similar como se hizo con la ecografía, se localiza como punto de referencia la arteria renal derecha, obteniéndose imágenes secuenciales de 2 mm de espesor, cada 2 mm, sin gap, con 20 cortes proximales a la arteria renal derecha y 20 cortes distales a la misma, cubriendo un total de 8 cm de longitud. Se obtuvieron imágenes tanto en secuencia T2W (TR/TE 2300/62 ms), con supresión de grasa y saturación de flujo, y en T1 (turbo spin

echo, resolución 0,4x0,4 mm; TR/TE 1000/15 ms). Tras el estudio se realizó un análisis de la carga de placa (área delineada por la membrana elástica externa-área luminal) tanto por segmentos, como la sumatoria del volumen de pared en los segmentos a estudiar, divididos en dos regiones, una por encima de la arteria renal derecha y otra por debajo de la misma.

Para este análisis se utilizó el programa VPDiagnostics (Seattle, Estados Unidos), delineando el borde interno y externo de la pared arterial en cada uno de los cortes obtenidos en T2W y confirmando los trazados con las imágenes obtenidas en T1, lo que permite obtener datos del volumen total de la pared arterial (se incluye el volumen de pared y el de la placa propiamente dicha) y de la luz del vaso, así como la relación entre ambos, denominado el índice normalizado de pared (Normalized Wall Index, NWI), que se calcula dividiendo el volumen de la pared entre el volumen total del vaso (incluyendo luz y pared) y multiplicado por 100, con la intención de eliminar la influencia de la luz arterial en el resultado. Además, se analizaron los espesores mínimo, medio y máximo de la pared arterial.

#### **4.2.4. Tomografía computarizada/tomografía por emisión de positrones con $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxiglucosa**

La actividad metabólica de la placa de ateroma fue evaluada mediante esta técnica. Para su realización se dejaban los animales en ayunas durante al menos 8 horas. Se realizaba glucometría para asegurar niveles normales de glucemia. Se inyectó  $^{18}\text{F}$ -FDG (37 MBq/kg [1 mCi/kg]) intravenoso, después de 180 minutos, se sedaban con una combinación de ketamina (10 mg/kg IM) y xilacina (2.5 mg/kg) y se procedía a obtener las imágenes con un equipo combinado de PET/TC (Gemini TF 64, Philips Health Care, Andover, MA, Estados Unidos). Se colocaron los conejos en decúbito prono en un soporte especialmente diseñado, sobre la camilla del equipo. Se obtuvieron imágenes de TC sin contraste a baja dosis (120 kV, 200 mA, tiempo de rotación 0.5 s, colimación 64 x 0.625 mm, índice de desplazamiento de 0.703, grosor de corte 2.0 mm) antes de realizar el PET para obtener imágenes anatómicas y realizar la corrección de los datos. Se obtuvieron las imágenes de PET de toda la aorta en 3 posiciones diferentes de la camilla, con una superposición del 50% (5

minutos por posición), para asegurar una sensibilidad adecuada en toda la región de interés. Las imágenes obtenidas se reconstruyeron con el algoritmo LOR-RAMLA del equipo. La matriz final de imágenes contenía 174 cortes de 128 x 128 voxels, cada voxel de 2.0 x 2.0 x 2.0 mm, se realizó correcciones para normalización, tiempo muerto, atenuación, dispersión, coincidencias aleatorias, sensibilidad y pérdida de actividad.

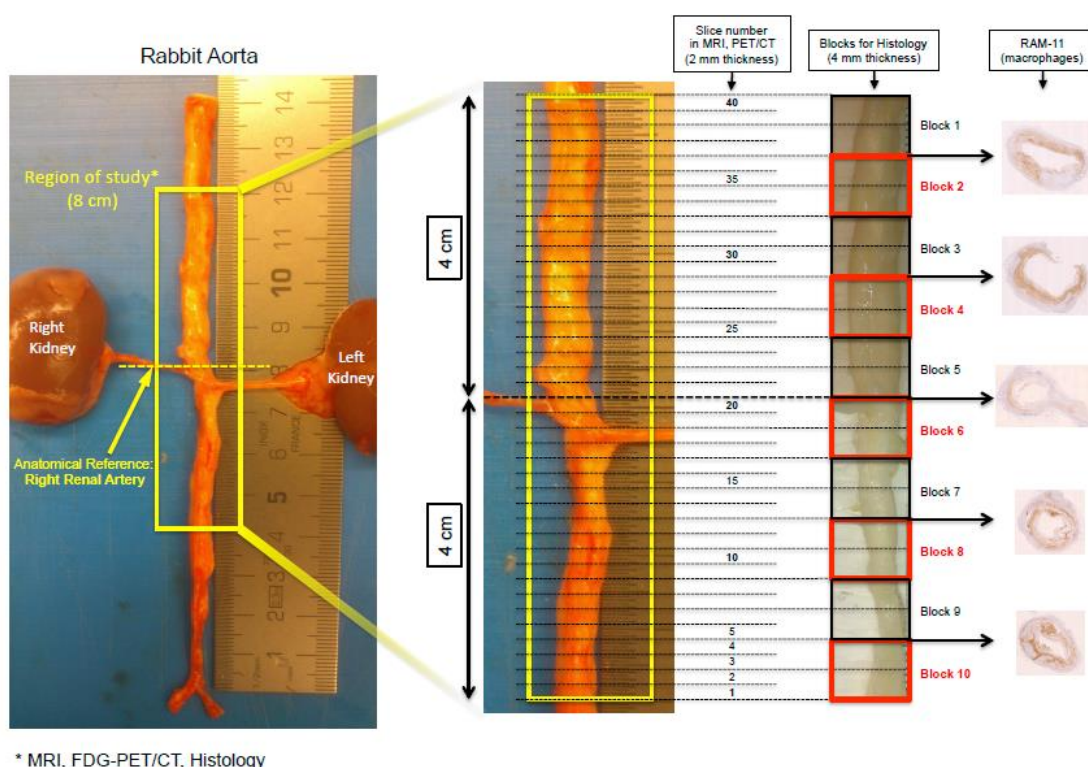
Para el análisis de las imágenes de PET se utilizó el programa OsiriX Imaging Software (Pixmeo, Génova, Suiza), donde se dibujaron de forma manual las regiones circulares de interés (Circular Regions of Interest, ROIs) englobando la pared del vaso correspondiente a los 8 cm de aorta abdominal, centrado en la arteria renal derecha, basado en las imágenes de TC. Se cuantificaron los valores de captación estandarizados (Standardized Uptake Values, SUV). Se obtuvieron los valores máximos de cada ROI (SUVmax) y se calculó el promedio a lo largo de los segmentos supra- e infrarrenal (SUVmean).

#### **4.2.5. Histología**

Después del sacrificio del animal se disecó de manera cuidadosa la aorta de cada conejo y se fijó en formalina al 10%. Posteriormente, manteniendo como referencia la arteria renal derecha al igual que en las técnicas de imagen, se obtuvieron 4 cm de aorta por encima de la arteria renal derecha y 4 cm por debajo de la misma (Figura 7). Se realizaron cortes de 4 mm de espesor, marcando su orientación fueron embebidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4 micrómetros de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina para el estudio histológico y con RAM-11 (dilución 1:1000, Dako, Glostrup, Dinamarca), un anticuerpo monoclonal de ratón contra macrófagos de conejo que permite su marcaje en tejido conectivo y vascular (100). Hay evidencias que sugieren que el cociente macrófago/célula muscular lisa está altamente relacionado con la inestabilidad de la placa. El análisis histológico del tamaño de la placa se realizó mediante planimetría informatizada de las preparaciones histológicas con el programa NDPviewer® (NDP.view2 Hamamatsu Photonics, Reino Unido). La presencia de macrófagos se describió como el porcentaje del área de la pared ocupada por

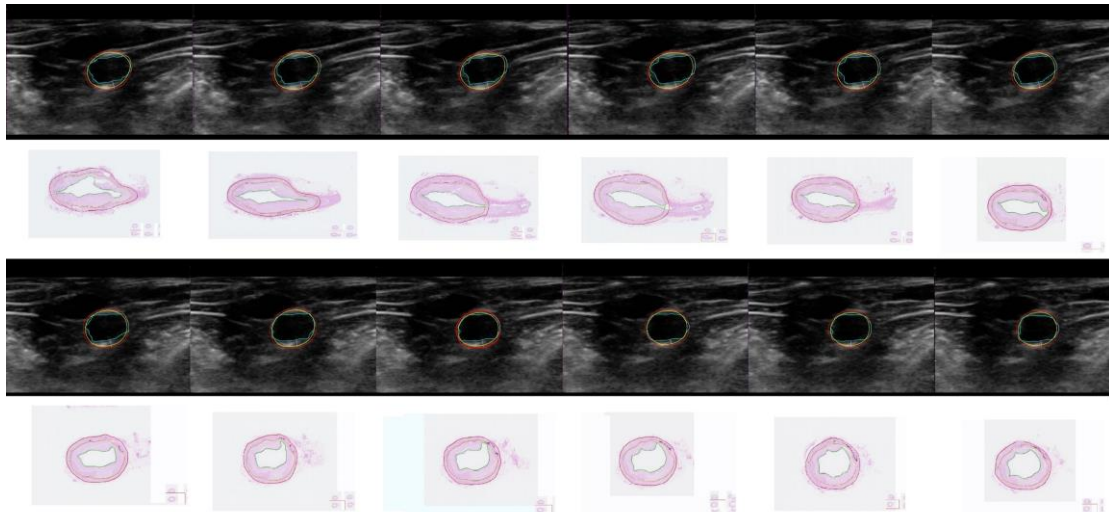
macrófagos por segmento.

Para la comparación histológica en el caso de la ecografía vascular se realizó un análisis específico del segmento interrenal de un conejo con placa aterosclerótica evidenciada a ese nivel. Se realizaron 20 cortes consecutivos simulando la resolución ecográfica 3D, determinando la suma de las áreas de placa en  $\text{mm}^2$ . El volumen de placa en  $\text{mm}^3$  se obtuvo multiplicando la suma de las áreas por la distancia entre las secciones (Figura 8).



### Figura 7: Preparación de las muestras para histología

Fotografía de la aorta de conejo obtenida en bloque, donde se pueden observar las arterias renales. Se utilizó la arteria renal derecha como marcador anatómico, a partir del cual se midieron 4 centímetros en craneal y 4 centímetros en caudal; posteriormente se seccionaba la pieza en bloques de 4 mm para correlacionar las diferentes pruebas de imagen in vivo con la histología (Cortesía de J. Mateo).



**Figura 8: Correlación entre la ecografía 3D y la histología**

*Para determinar la correlación entre la ecografía vascular 3D y la histología se realizaron 20 cortes histológicos en el segmento interrenal donde previamente se había objetivado placa aterosclerótica por la ecografía 3D.*

#### 4.2.6. Análisis del plasma

Se obtuvieron muestras de sangre en ayunas de una vena marginal de la oreja en tubos con EDTA tanto a las 18 semanas como a las 35 semanas. Las muestras fueron centrifugadas (2000 x g por 20 minutos a 4°C) y las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta realizar el análisis del perfil lipídico de cada conejo.

### 4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Basándose en la experiencia previa del laboratorio receptor y del doctor Ibáñez (40), la mortalidad global de un modelo de aterosclerosis similar al propuesto, con estudios de imagen que requieren la anestesia de los animales, está en torno al 30-35%. Se decidió incluir 10 conejos en el estudio, siendo la mortalidad final del 20%, menor a la esperada, se analizaron 8 conejos, separando, en el caso de la resonancia, la aorta en los segmentos supra- e infrarrenal, donde se obtuvieron 16 segmentos para analizar.

Los resultados descriptivos cuantitativos se presentan como media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico según corresponda. Las diferencias entre grupos se calculan como medias y las comparaciones evolutivas con el test t-student para muestras apareadas. Para un sub-análisis

de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el PET se desarrolló un método automático para eliminar las regiones de interés (ROIs) “contaminadas” por captación externa a la aorta, principalmente tubo digestivo (Matlab®, The MathWorks, Natick, Massachusetts, Estados Unidos).

Se determinaron las diferentes correlaciones con el método de Pearson. La concordancia entre diferentes técnicas se representa gráficamente con el método de Bland-Altman. Para el análisis estadístico se utilizó R, versión 3.4.0 (The R Foundation for Statistical Computing). Los valores de probabilidad menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Las distribuciones de los valores recogidos se muestran a través de diagramas de cajas.

## 5. RESULTADOS

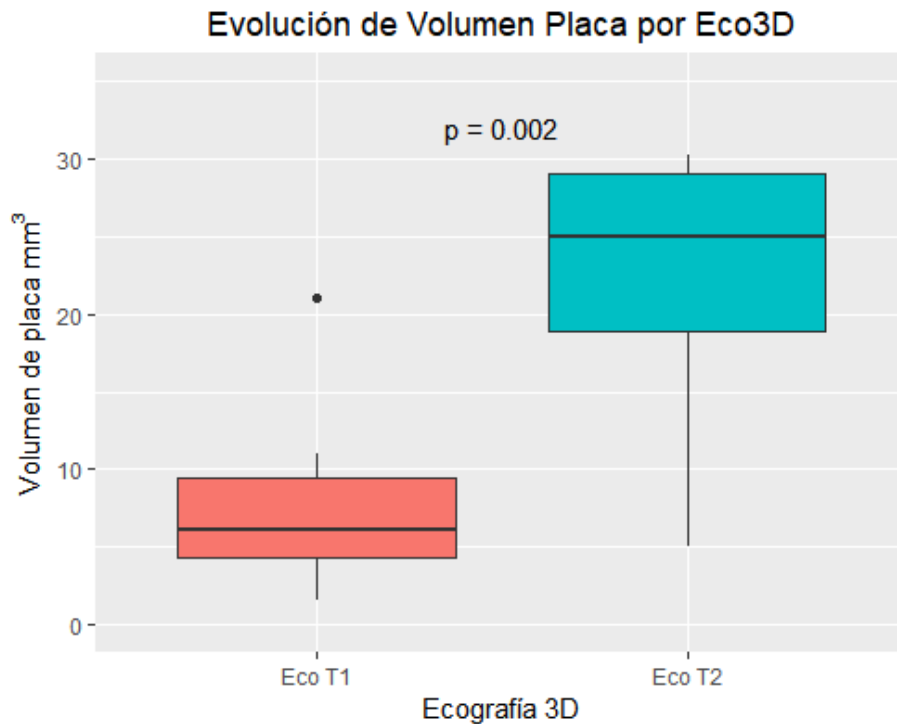
---

Se incluyeron 10 conejos en el estudio, completando el mismo 8, una mortalidad del 20%; un conejo murió en relación al procedimiento de denudación aórtica y otro a consecuencia de la dieta hipercolesterolémica. Se describen los resultados de los animales que completaron el estudio.

### 5.1. Estudio de la aorta con ecografía 3D

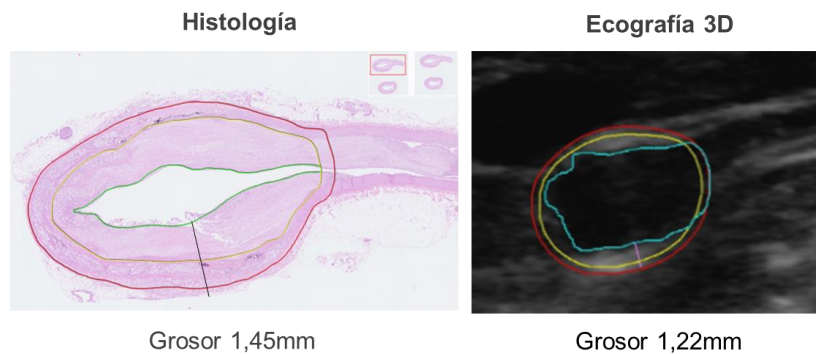
El volumen promedio de placa en la primera ecografía vascular 3D fue de  $7.75 \pm 6.17 \text{ mm}^3$  (IC 95%: 1.58 – 13.92), con una mediana de  $6.11 \text{ mm}^3$  (RI: 4.33 – 9.41). El volumen promedio en la ecografía final fue de  $21.71 \pm 10 \text{ mm}^3$ , con una mediana de  $24.91 \text{ mm}^3$  (RI: 18.84 – 29.01), siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.0024$ ). Las diferencias relativas en el cambio de placa no siguen una distribución normal (test de Shapiro-Wilk  $p = 0.001$ ). La mediana del crecimiento relativo fue del 171.6% (RI: 63.8 – 361.4) (Figura 9).

Se evaluó la concordancia con la histología, comparando las medidas del área de placa en el segmento interrenal de un conejo en el que se objetivó placa por la ecografía, siendo la medida por histología  $2.5 \text{ mm}^2$  mayor que con la ecografía, pero manteniendo una buena concordancia entre dichas medidas (Figura 10). Se analizó la correlación entre el volumen total de las placas visualizadas en la adquisición por ecografía, con el volumen de la pared del segmento evaluado por resonancia sin que existiera una correlación significativa ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.454$ , Figura 11), al realizar la comparación limitada a las zonas donde se observó placas con la ecografía 3D, sí que existe una correlación moderada, que es estadísticamente significativa ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.028$ , Figura 12).



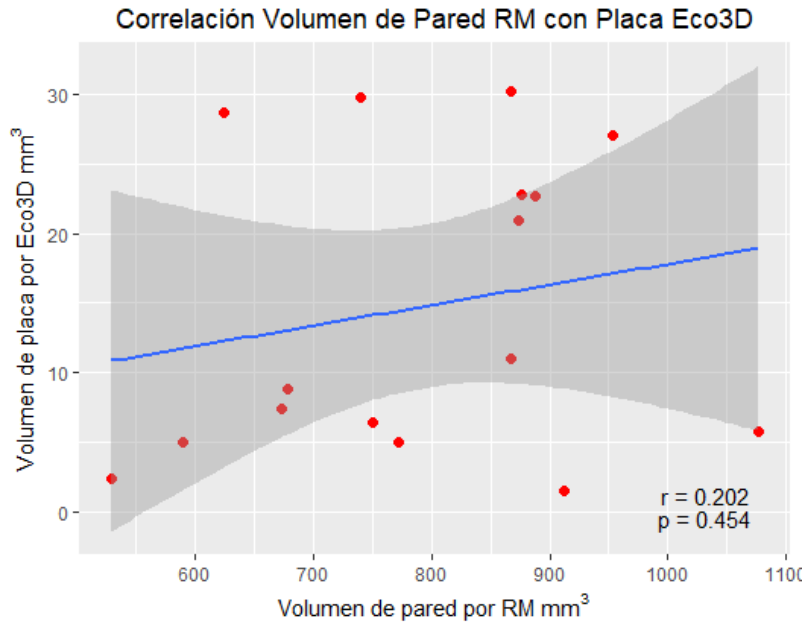
**Figura 9: Evolución del volumen de placa por ecografía 3D**

Evolución del volumen de placa estudiado con ecografía 3D, evidenciando un incremento del 171.6% ( $p = 0.002$ ) entre el T1 y T2. T1: tiempo 18 semanas, T2: tiempo 35 semanas.



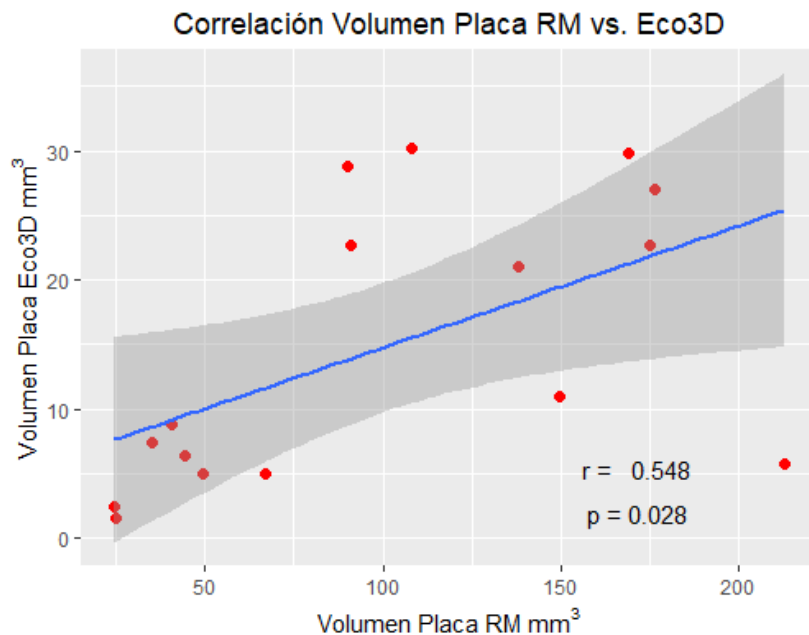
**Figura 10: Comparación de la medición por histología con la ecografía vascular 3D**

Segmento representativo de la región de la salida de la arteria renal derecha, comparando la histología con la imagen obtenida por ecografía vascular 3D, se observa que el grosor de la pared es mayor en la histología que en la ecografía.



**Figura 11: Correlación entre el volumen de placa por ecografía 3D y el volumen total de la pared aórtica**

Evaluación de la correlación entre el volumen de la placa aterosclerótica medida por ecografía 3D con el volumen de la pared arterial medida por resonancia. No se objetiva correlación significativa entre ambas técnicas.

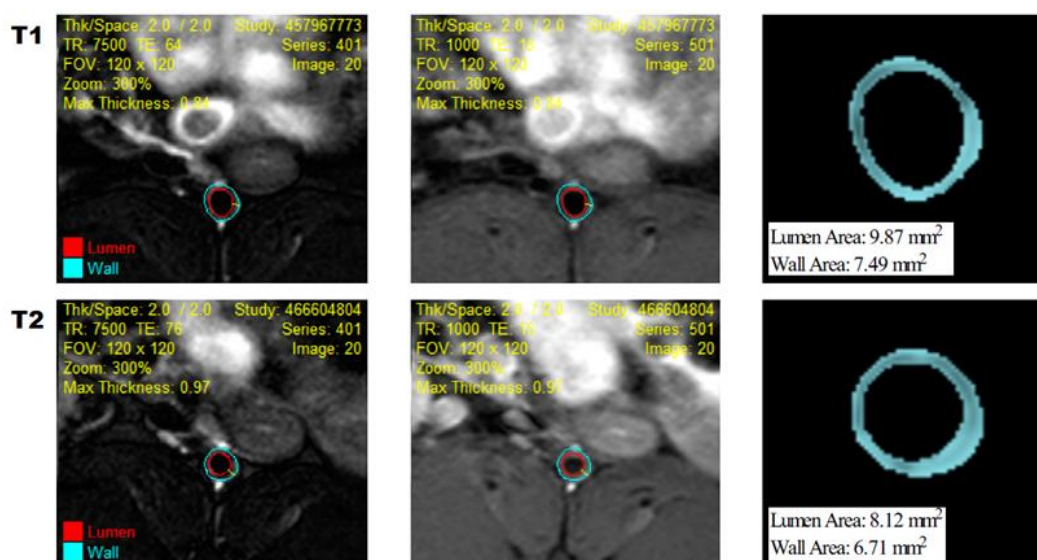


**Figura 12: Correlación entre el volumen de placa por ecografía 3D y el volumen de pared de sus segmentos correspondientes por resonancia**

Correlación entre el volumen de placa medido por ecografía 3D y el volumen de la pared en los segmentos donde se observó la placa por ecografía, apreciándose una correlación moderada, estadísticamente significativa.

## 5.2. Estudio de la aorta con RM

Completaron el estudio un total de 8 conejos, siendo analizados 16 segmentos de aorta (Figura 13). Los datos se describen en la Tabla 2. Además, se analizaron 4 resonancias de conejos sanos que sirvieron de control. El volumen promedio de la pared del vaso en la primera resonancia fue de  $414 \pm 97 \text{ mm}^3$ , mediana  $422 \text{ mm}^3$  (RI: 347 – 478) con un coeficiente de variación de 23.4% (Figura 14). La evolución del área promedio se muestra en la Figura 15. El volumen promedio de la luz del vaso fue de  $564 \pm 222 \text{ mm}^3$ , mediana 589 (RI 387 – 760) con un coeficiente de variación de 39.4% (Figura 16). La evolución del área luminal promedio se muestra en la Figura 17. El volumen total de la aorta fue de  $979 \pm 310 \text{ mm}^3$  (Figura 18). El índice normalizado de la pared (NWI), que correlaciona el volumen de la pared con el volumen de la luz del, fue  $44.4 \pm 6.8$ , con una mediana de 43.1 (RI: 38.7 – 48.3) (Figura 19). El espesor máximo de la pared fue de  $1.04 \pm 0.15 \text{ mm}$  (Figura 20). El espesor medio de la pared fue de  $0.68 \pm 0.08 \text{ mm}$ , mediana 0.69 (RI 0.67 – 0.72) (Figura 21). El espesor mínimo de la pared fue de  $0.40 \pm 0.07 \text{ mm}$ , mediana 0.39 (RI: 0.34 – 0.45) con un coeficiente de variación de 17.13% (Figura 22)



**Figura 13: Medición de la pared arterial con la resonancia**

*Ejemplo de medición del área de la pared y el área luminal de la aorta de conejo en los dos tiempos del estudio. T1: tiempo 18 semanas, T2: tiempo 35 semanas.*

Se comparó las diferentes medidas realizadas con el test t de student para muestras relacionadas en el caso de los conejos con aterosclerosis, y con

t de student para muestras independientes en las comparaciones con los controles: Comparando la primera resonancia en los conejos con aterosclerosis respecto a los controles, el volumen de pared es 96% mayor ( $p < 0.001$ ), el volumen luminal es 40% mayor, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0.214$ ). El volumen total aórtico es un 45% mayor ( $p = 0.009$ ). También existen diferencias significativas respecto al espesor máximo de la aorta que es un 70% mayor ( $p < 0.001$ ). Las diferencias en el espesor medio y mínimo, también son importantes (65.8% y 74%), ambas con  $p < 0.001$ .

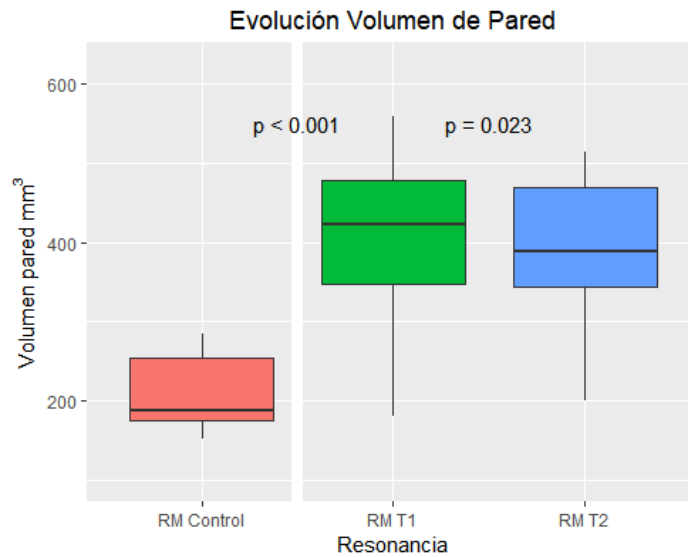
Entre la resonancia inicial y final hubo una pérdida del 6.3% del volumen total de la pared ( $p = 0.023$ , Figura 14), una pérdida del 22.9% del volumen de la luz de la aorta ( $p < 0.001$ , Figura 16), y una pérdida del 15.9% del volumen aórtico total ( $p < 0.001$ , Figura 18). Hubo un incremento del 11.9% del índice normalizado del volumen de la pared ( $p < 0.001$ , Figura 19). El espesor máximo se incrementó en 17.3% ( $p = 0.008$ , Figura 20). El espesor medio de la pared se incrementó un 4.4% ( $p = 0.120$ , Figura 21). El espesor mínimo se incrementó un 12.5% ( $p = 0.063$ , Figura 22). Existe una alta correlación entre el NWI y el volumen de pared inicial con el final, mostrando que las mediciones se mantienen concordantes en el tiempo (Figura 23). Al valorar la evolución del NWI se observó que a mayor índice en la primera resonancia había un menor incremento del mismo en la segunda resonancia (Figura 24).

Se evaluó la concordancia de las mediciones del área de la pared con los cortes equivalentes en la histología, observando una buena concordancia al comparar los cortes a nivel del segmento interrenal, con un índice de correlación intraclase de 0.72, en los cuales la co-localización anatómica es más exacta (Figura 25-A). Al comparar todos los cortes, disminuye ligeramente la concordancia, con un índice de correlación intraclase de 0.53 (Figura 25-B). Los mismos datos se correlacionaron con el método de Pearson, mostrando que la correlación entre ambas técnicas es alta ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.038$  y  $r = 0.53$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente; Figura 26).

Resonancia Magnética							
	RM Control Media ± DE	RM T <sub>1</sub> Media ± DE	RM T <sub>2</sub> Media ± DE	% variación Control – T <sub>1</sub>	p Control-T <sub>1</sub>	% variación T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>	p T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>
Volumen pared (mm <sup>3</sup> )	211 ± 53	414 ± 97	388 ± 94	96.2%	< 0.001	-6.3%	0.023
Área pared media (mm <sup>2</sup> )	5.28 ± 1.32	10.36 ± 2.46	9.70 ± 2.35	96.2%	< 0.001	-6.3%	0.023
Volumen luminal (mm <sup>3</sup> )	463 ± 159	564 ± 222	435 ± 184	21.8%	0.214	-22.9%	< 0.001
Área luminal media (mm <sup>2</sup> )	11.58 ± 3.97	14.11 ± 5.56	10.88 ± 4.60	21.8%	0.214	-22.9%	< 0.001
Volumen aórtico total (mm <sup>3</sup> )	674 ± 205	979 ± 310	823 ± 275	45.3%	0.009	-15.9%	< 0.001
NWI	32.1 ± 4.6	44.4 ± 6.8	49.7 ± 6.5	38.3%	< 0.001	11.9%	< 0.001
Grosor máximo pared (mm)	0.61 ± 0.04	1.04 ± 0.15	1.22 ± 0.23	70.5%	< 0.001	17.3%	0.008
Grosor medio pared (mm)	0.41 ± 0.06	0.68 ± 0.08	0.71 ± 0.05	65.9%	< 0.001	4.4%	0.120
Grosor mínimo pared (mm)	0.23 ± 0.07	0.40 ± 0.07	0.45 ± 0.10	73.9%	< 0.001	12.5%	0.063

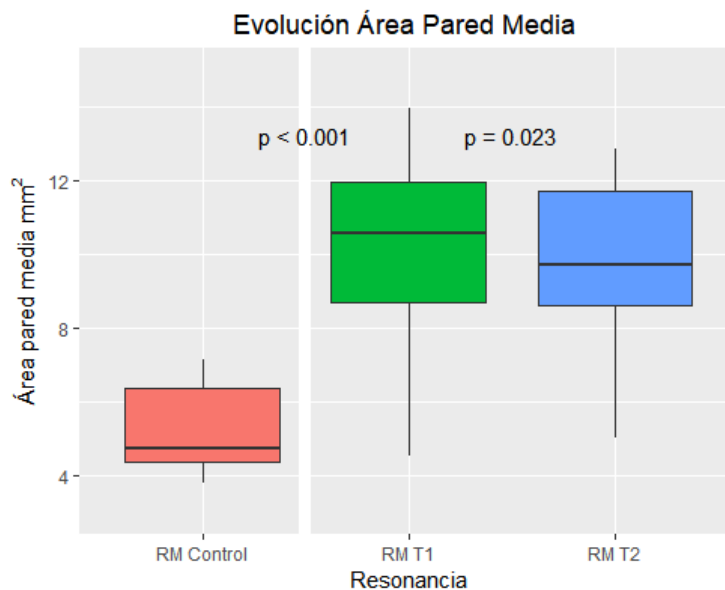
**Tabla 2: Mediciones de resonancia magnética control, 18 semanas y 35 semanas**

Se observan diferencias significativas en la disminución del volumen de pared, volumen luminal y volumen aórtico total; así mismo se observa un aumento estadísticamente significativo del NWI y el grosor máximo de la pared. DE: desviación estándar; NWI: Normalized Wall Index, RM T<sub>1</sub>: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T<sub>2</sub>: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



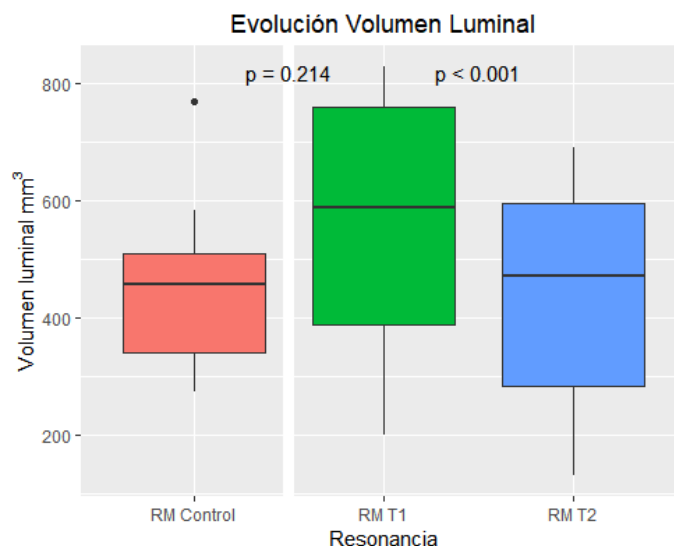
**Figura 14: Evolución del volumen total de la pared de la aorta**

Evaluación por resonancia magnética en los dos tiempos estudiados, y comparado con los controles. El volumen es un 96.2% mayor a los controles ( $p < 0.001$ ). Evolucionando reduciéndose un 6.3% entre ambos estudios, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.023$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



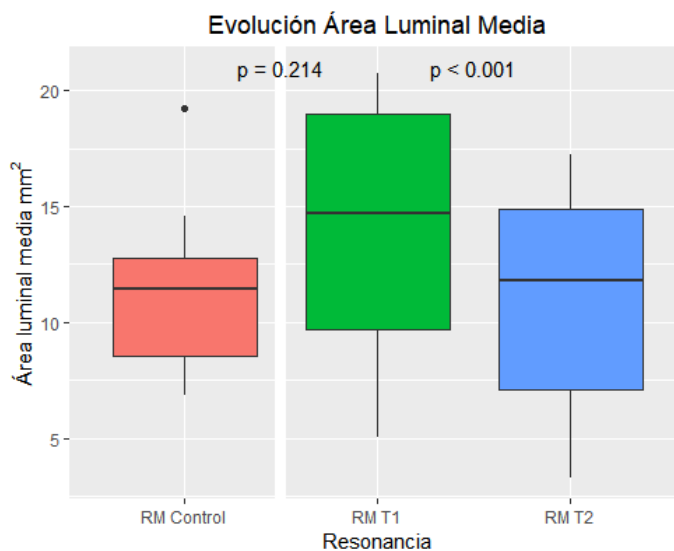
**Figura 15: Evolución del área promedio de la pared de la aorta**

Evaluación por resonancia magnética en los dos tiempos del estudio y comparado con los controles. Se evidencia que el área de la pared es mayor en los conejos con aterosclerosis que en los controles, reduciéndose ligeramente, de forma estadísticamente significativa ( $p = 0.023$ ) entre los dos tiempos estudiados. RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



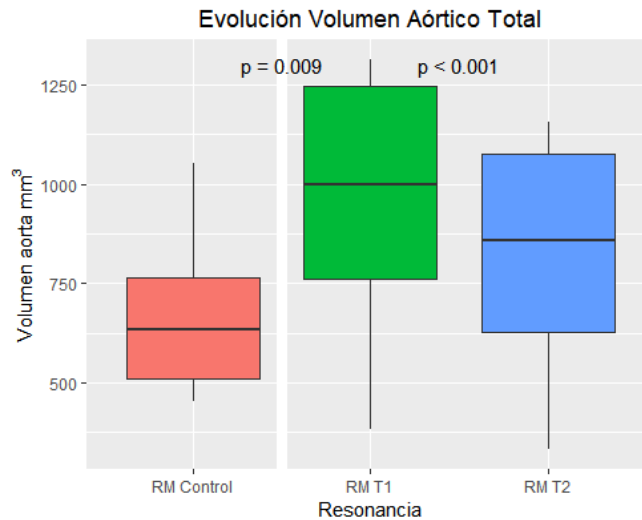
**Figura 16: Evolución del volumen luminal de la aorta**

Evaluación por resonancia magnética en los dos tiempos estudiados, y comparado con los controles. El volumen luminal en la primera resonancia es un 21.8% mayor que en los controles, aunque no alcanza la significación estadística ( $p = 0.214$ ). Existe una disminución del 22.9% del volumen luminal en la evolución, siendo la reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



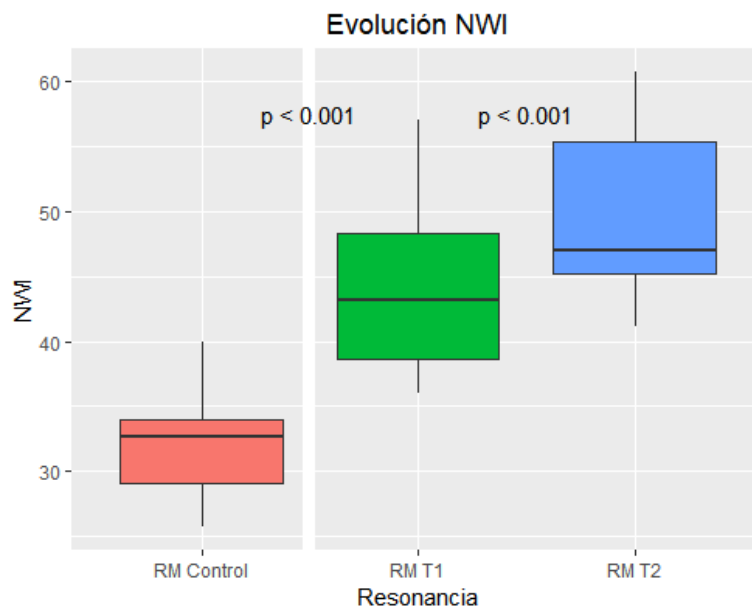
**Figura 17: Evolución del área luminal media de la aorta**

Evaluación en las dos resonancias realizadas, y comparada con los controles. El área promedio es mayor que en los controles, sin que la diferencia sea estadísticamente significativa. La evolución es a una disminución significativa del 22.9% del área ( $p < 0.001$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



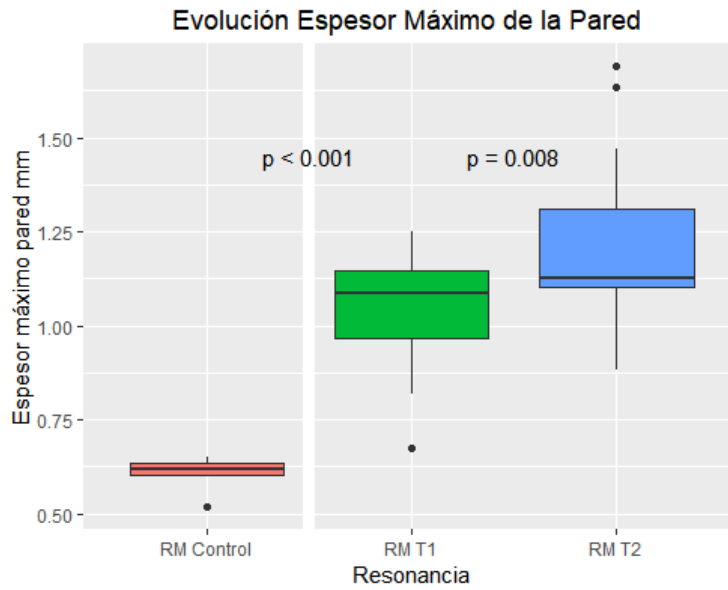
**Figura 18: Evolución del volumen total de la aorta**

Evaluación del volumen aórtico total; es decir, incluyendo el volumen luminal y el volumen de la pared, comparado con los controles. Se observa que en la primera resonancia es significativamente mayor que en los controles ( $p = 0.009$ ). En la segunda resonancia hay una reducción del 16% del volumen aórtico total ( $p < 0.001$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



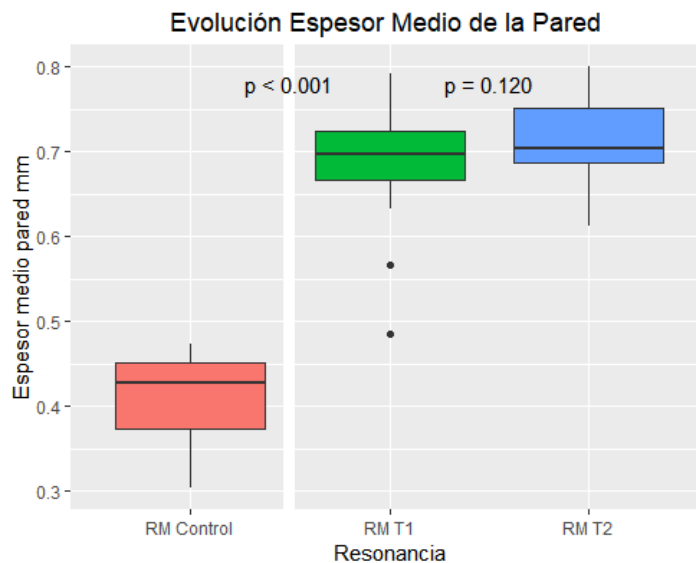
**Figura 19: Evolución del índice normalizado de la pared (NWI)**

Evaluación por resonancia magnética en los dos tiempos estudiados, y comparado con los controles. El NWI es mayor en los conejos con aterosclerosis comparado con los controles ( $p < 0.001$ ). Existe un aumento del 11.9% entre ambas resonancias ( $p < 0.001$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



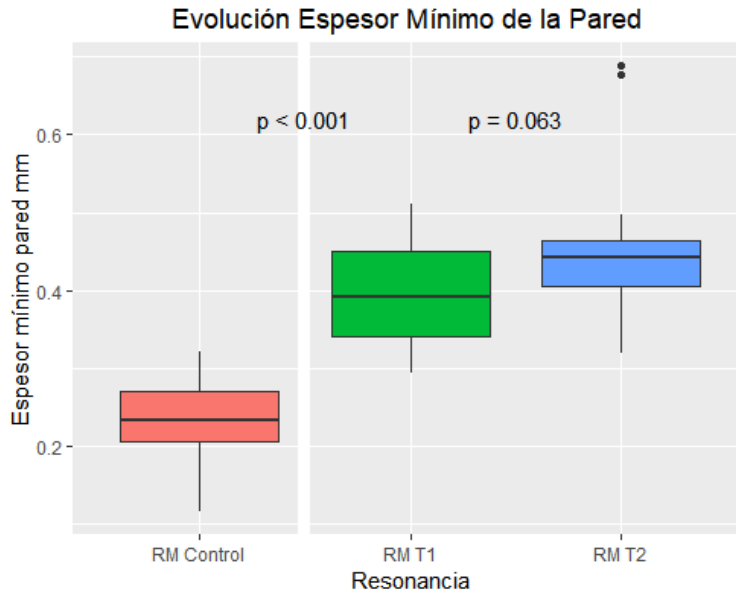
**Figura 20: Evolución del grosor máximo de la pared arterial**

Evaluación por resonancia magnética en los dos tiempos estudiados y comparado con los controles. Las diferencias son significativas respecto a los controles ( $p < 0.001$ ). En la evolución existe un aumento significativo del 17.3% ( $p = 0.008$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



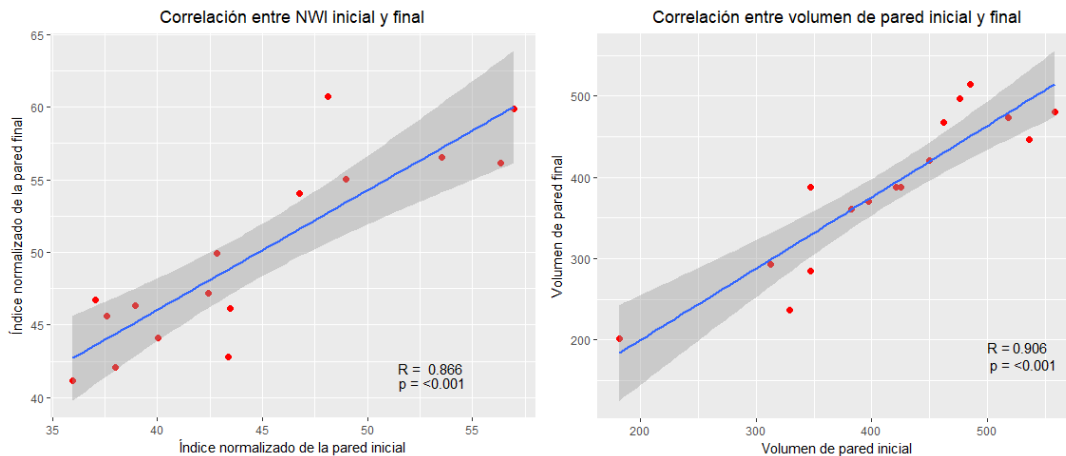
**Figura 21: Evolución del grosor medio de la pared arterial**

Evaluación por resonancia magnética de la evolución en los dos tiempos de estudio y comparada con los controles. El espesor medio es significativamente mayor que en los controles ( $p < 0.001$ ). Se observa un ligero incremento del mismo en la evolución (4.4%) que no es estadísticamente significativo ( $p = 0.120$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.



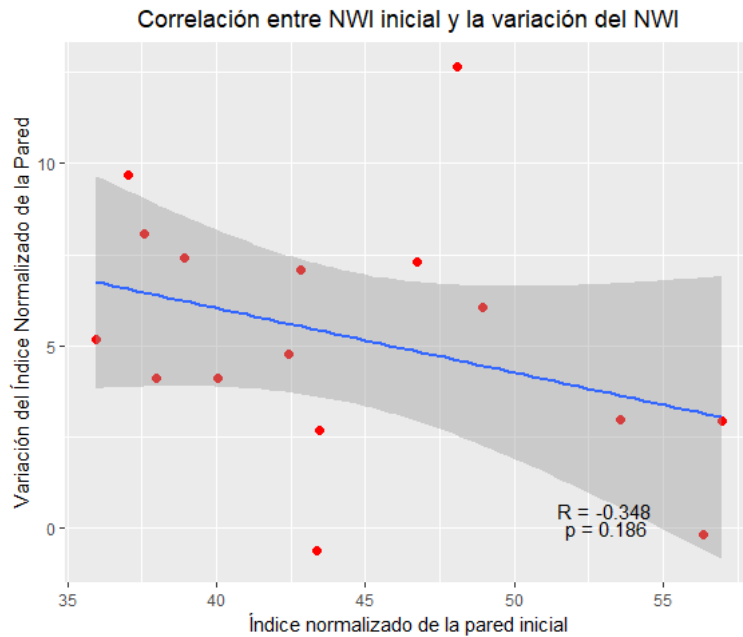
**Figura 22: Evolución del grosor mínimo de la pared arterial**

Evaluación por resonancia magnética de la evolución del grosor mínimo de la pared arterial, comparada con los controles. Se observa que éste es significativamente mayor que en los controles. Entre ambas resonancias existe un incremento del 12.5%, aunque no alcanza la significación estadística ( $p = 0.063$ ). RM T1: resonancia magnética a las 18 semanas, RM T2: resonancia magnética a las 35 semanas; RM control: resonancia magnética en el grupo de conejos control.

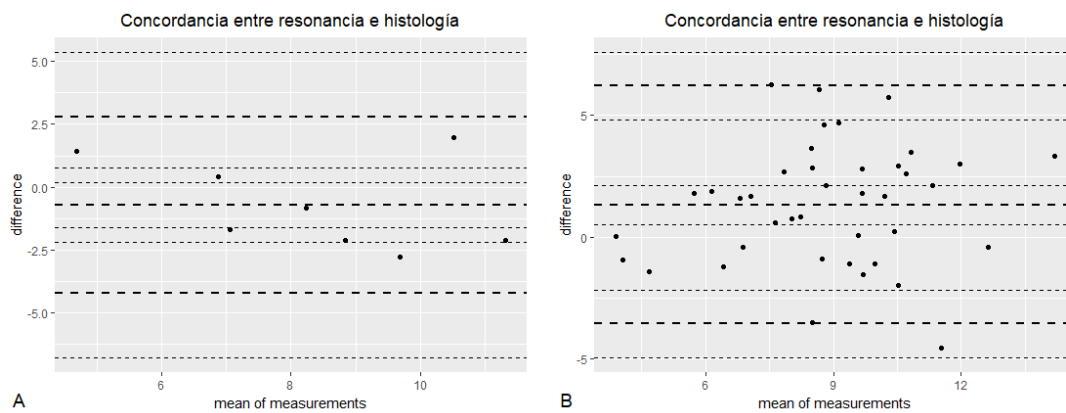


**Figura 23: Correlación de las mediciones iniciales con las finales del NWI y el volumen de pared aórtica**

Evaluación por resonancia magnética del NWI y del volumen de la pared, que muestra una alta correlación entre las medidas obtenidas en la primera y segunda resonancia, mostrando que los cambios observados en la primera resonancia se mantienen en el tiempo. NWI: índice normalizado de la pared.

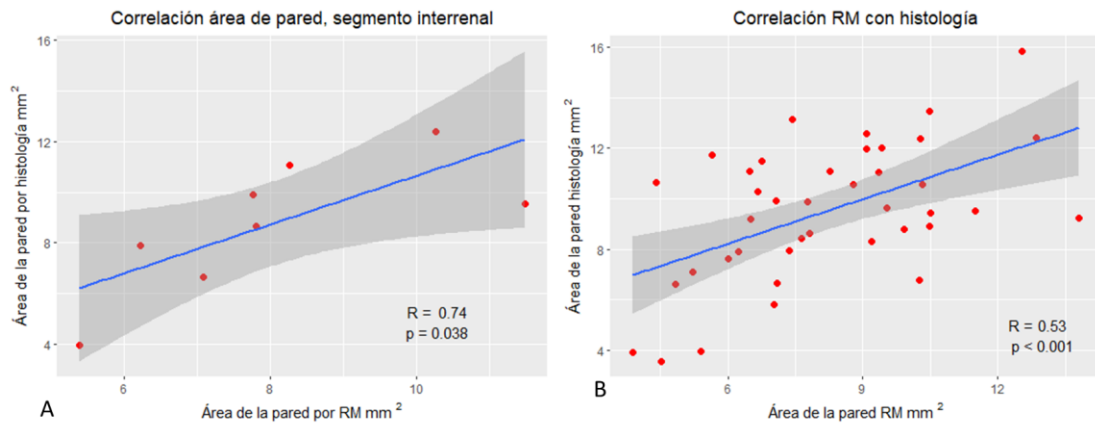


**Figura 24: Correlación entre el NWI inicial y su variación en el tiempo**  
 Evaluación del índice normalizado de la pared (NWI) medido en la primera resonancia y la variación del mismo en el seguimiento, muestra una tendencia a una correlación negativa, es decir, a mayor NWI inicial, menor variación del mismo en el seguimiento. NWI: índice normalizado de la pared.



**Figura 25: Concordancia del área de la pared entre resonancia e histología**

Gráfico de Bland Altman que muestra una adecuada concordancia entre el área de la pared medida por resonancia y el área medida por histología. En la figura A evaluando sólo los cortes a nivel del segmento interrenal. En la figura B se muestran todos los cortes evaluados por histología con su correspondiente corte en la resonancia. La concordancia es mejor a nivel del corte interrenal ya que la co-localización anatómica es más exacta.



**Figura 26: Correlación del área de la pared entre resonancia e histología**  
 Correlación entre las medidas de la pared realizadas por resonancia y los cortes histológicos. En el panel A se analiza solamente el segmento interrenal en el que la co-localización con la histología es más exacta, siendo la correlación alta ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.038$ ). En el panel B se observa la correlación de todos los cortes histológicos con su equivalente en resonancia, observando una adecuada correlación ( $r = 0.53$ ,  $p < 0.001$ ).

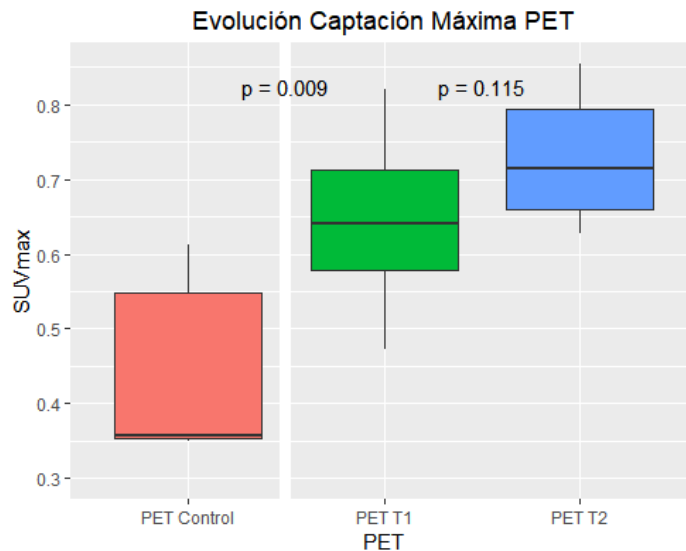
### 5.3. Estudio de la aorta con PET

En el estudio de PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG (Tabla 3), se objetiva que la captación es significativamente mayor en los conejos con aterosclerosis que en los controles. En los conejos del estudio la captación máxima (SUVmax) se incrementó un 15.3%, de 0.72 a 0.83, y la captación media (SUVmean) en un 13.2%, de 0.53 a 0.60, aunque sin que las diferencias sean estadísticamente significativas ( $p = 0.115$  y  $0.103$  respectivamente). Al analizar las medidas corregidas, el porcentaje de variación es similar en la captación máxima (15.4%) y ligeramente mayor en la captación media (16.3%), con una mayor tendencia a la significación estadística ( $p = 0.072$ , Figura 27 y Figura 28).

Tomografía por emisión de positrones con <sup>18</sup> F-FDG							
	PET Control	PET T <sub>1</sub>	PET T <sub>2</sub>	% variación	p	% variación	p
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Control - T <sub>1</sub>	Control-T <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>
SUVmax	0.44 ± 0.13	0.72 ± 0.24	0.83 ± 0.17	63.6%	0.009	15.3%	0.115
SUVmean	0.34 ± 0.05	0.53 ± 0.16	0.60 ± 0.13	55.9%	0.003	13.2%	0.103
SUVmax, corregido	-	0.65 ± 0.12	0.72 ± 0.08	-	-	15.4%	0.230
SUVmean, corregido	-	0.49 ± 0.11	0.57 ± 0.07	-	-	16.3%	0.072

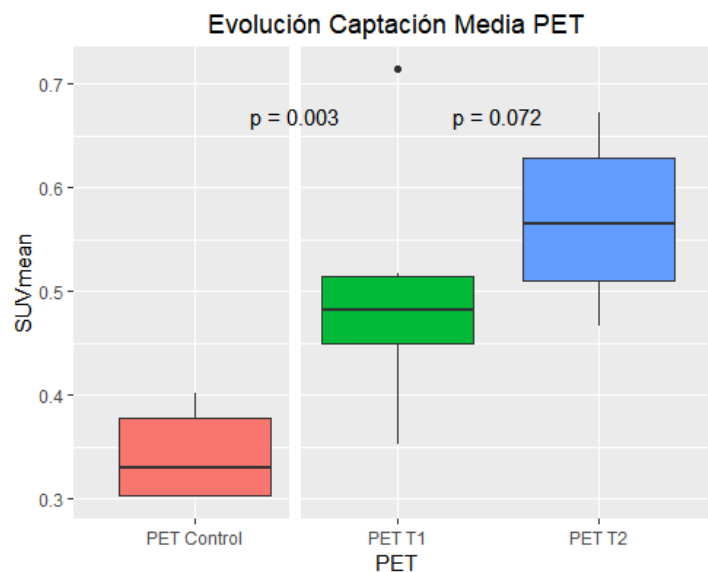
**Tabla 3: Captación de <sup>18</sup>F-FDG en el PET inicial, final y control**

Se observan diferencias significativas entre la captación en los controles y los conejos con aterosclerosis. Existe un incremento de la captación entre la semana 18 y la semana 35 que no llega a ser estadísticamente significativo. DE: desviación estándar; PET T<sub>1</sub>: tomografía por emisión de positrones a las 18 semanas; PET T<sub>2</sub>: tomografía por emisión de positrones a las 35 semanas; PET control: tomografía por emisión de positrones en el grupo de conejos control.



**Figura 27: Evolución de la captación máxima en el PET**

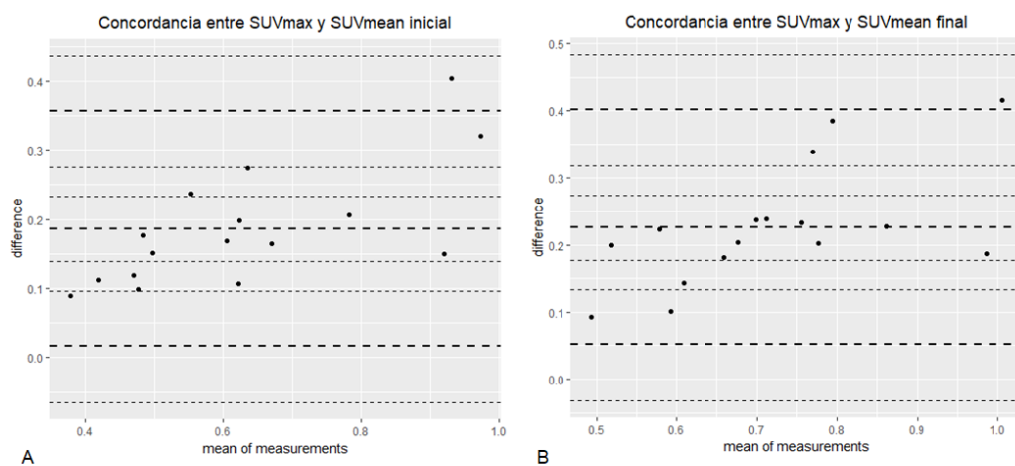
En la evolución de la captación máxima en el PET en los dos tiempos estudiados, comparado con los controles. Se observa un incremento del 23%, sin que las diferencias sean estadísticamente significativas ( $p = 0.115$ ). La captación máxima es 63.6% mayor que en los controles ( $p = 0.009$ ). PET T1: tomografía por emisión de positrones a las 18 semanas, PET T2: tomografía por emisión de positrones a las 35 semanas; PET control: tomografía por emisión de positrones en el grupo de conejos control.



**Figura 28: Evolución de la captación media en el PET**

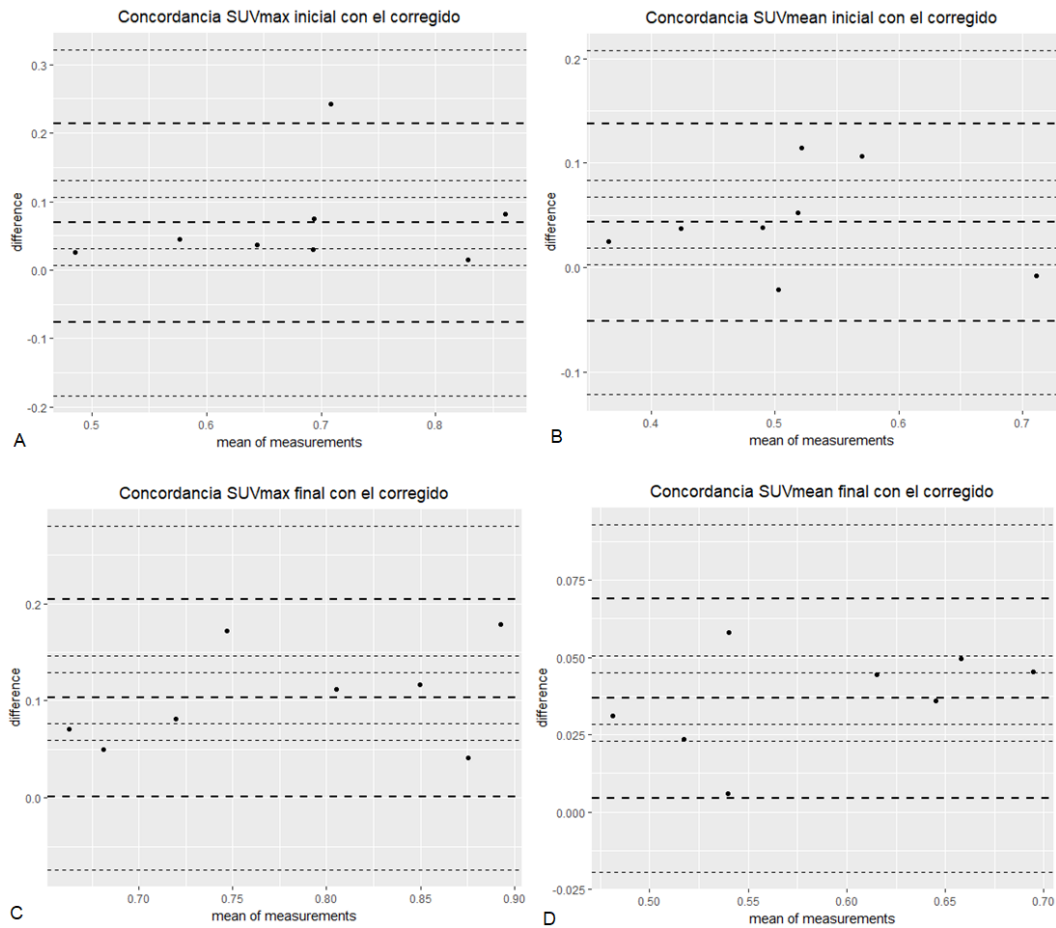
A la izquierda, en rojo, se muestra la captación de los controles, la captación en el primer PET de los conejos con aterosclerosis es 55.9% mayor que en los controles ( $p = 0.003$ ), incrementándose un 13.2 % en el PET a las 35 semanas, sin llegar a ser estadísticamente significativo ( $p = 0.072$ ). PET T1: tomografía por emisión de positrones a las 18 semanas, PET T2: tomografía por emisión de positrones a las 35 semanas; PET control: tomografía por emisión de positrones en el grupo de conejos control

Se evaluó la concordancia entre las mediciones de la captación máxima y media con el método de Bland-Altman, tanto en valores brutos, como los valores corregidos. Se observa principalmente la corrección de un valor en la captación máxima inicial, que es la que sale del 95% de valores de confianza. Los valores de captación máxima son consistentemente 0.2 puntos mayores que los valores de la captación media como corresponde al método, tanto en el PET inicial como en el PET final (Figura 29 y Figura 30).



**Figura 29: Concordancia entre la captación máxima y media en el PET**

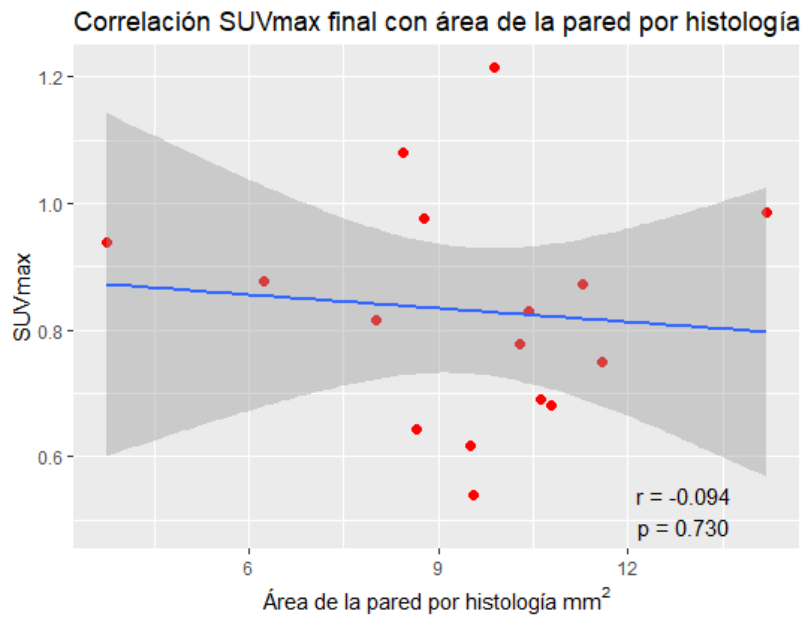
*Gráficos de Bland-Altman para valorar la concordancia entre las medidas obtenidas al medir la captación máxima (SUVmax) y la captación media (SUVmean), observándose una buena concordancia entre ambas mediciones.*



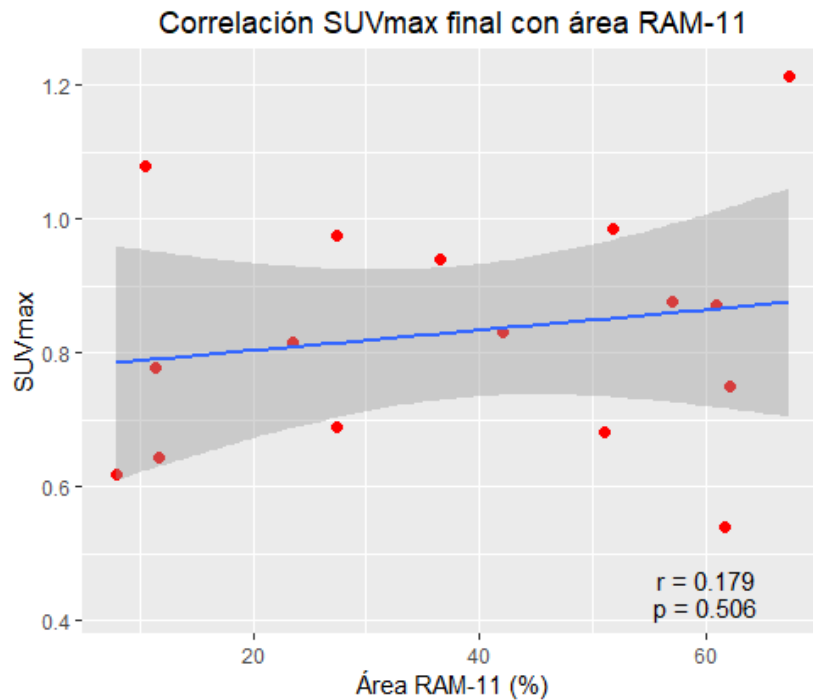
**Figura 30: Concordancia entre las medidas del PET corregidas y sin corregir**

Gráficos de Bland-Altman valorando la concordancia de las medidas máxima y media del PET corregidas, con las medidas sin corregir, tanto en el PET inicial (A y B), como en el PET final (C y D). Muestra que la media en las medidas sin corregir es ligeramente mayor que en las medidas corregidas, con buena concordancia, salvo casos aislados donde la corrección ha sido mayor, representando los artefactos eliminados por el método de corrección.

Se estudió la correlación de la captación del PET final con el área de la pared medida por histología, sin que exista ninguna correlación ( $r = -0.094$ , Figura 31). Se evaluó la correlación entre el área relativa de macrófagos medida con la tinción RAM-11 y la captación del PET, sin que exista una correlación significativa ( $r = 0.179$ , Figura 32).



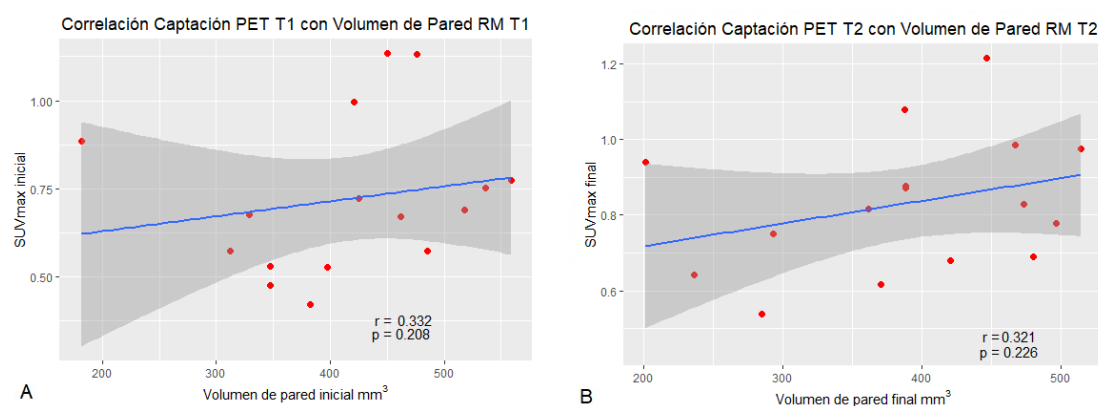
**Figura 31: Correlación entre el PET y el área por histología**  
 Correlación entre el área de la pared aórtica medida por histología y la captación máxima en el PET, sin que exista ninguna correlación entre ambas mediciones.



**Figura 32: Correlación entre el PET y área relativa de macrófagos por inmunohistoquímica**  
 Correlación entre la captación máxima en el PET final con el área relativa de macrófagos con la tinción de RAM-11 en la histología, sin que exista una correlación significativa ( $r = 0.179$ ,  $p = 0.506$ ).

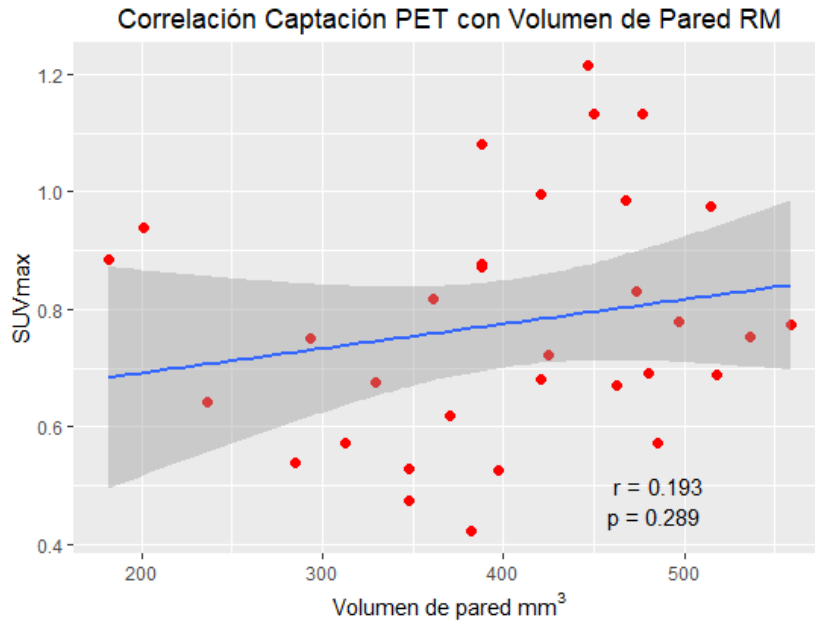
#### 5.4. Correlación del PET con los estudios anatómicos de placa

Se correlacionó la captación del PET con la presencia de aterosclerosis evaluado por las diferentes técnicas de imagen. También se estudió la relación que tiene con la variación del volumen de las mismas, para determinar su capacidad de predecir la progresión de la aterosclerosis en el modelo. Ni la captación máxima del PET inicial, ni del PET final presentan correlación con el volumen de la pared medido por resonancia ( $r = 0.332$  y  $r = 0.321$ , respectivamente, Figura 33). Al analizar el volumen de pared de las dos resonancias en conjunto, con la captación del PET, existe una ligera tendencia a una correlación positiva, que no es estadísticamente significativa ( $r = 0.193$ ,  $p = 0.289$ , Figura 34). La relación con el espesor máximo inicial presenta tendencia a una correlación inversa, sin ser estadísticamente significativa ( $r = -0.430$ ,  $p = 0.096$ ), que es neutra en el PET final ( $r = 0.030$ ,  $p = 0.912$ , Figura 35). Al comparar la captación con el NWI, presenta una correlación global inversa no significativa ( $r = -0.268$ ,  $p = 0.139$ ) similar si se analizan por separado ambos tiempos ( $p = 0.109$  y  $0.106$ , Figura 36).



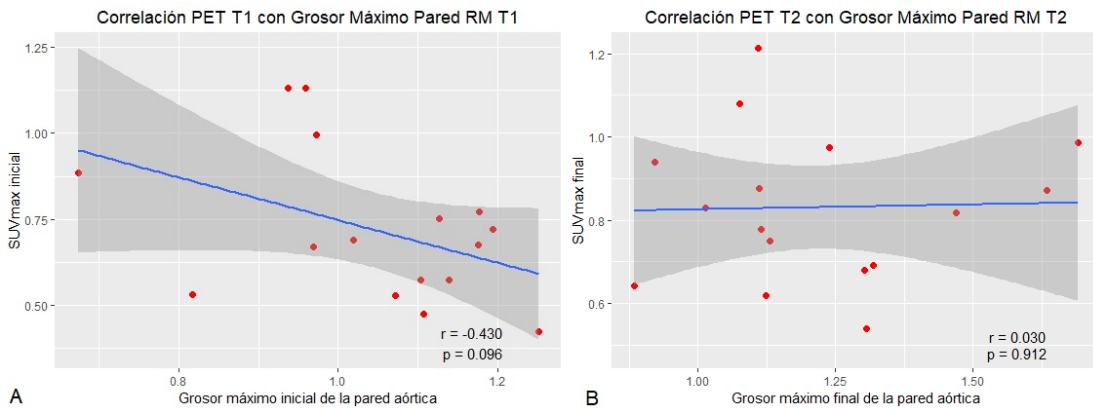
**Figura 33: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de pared por resonancia**

*Correlación entre la captación máxima en el PET y el volumen de pared valorado con resonancia, tanto en el estudio inicial (figura A) como en el estudio final (figura B), sin que exista correlación entre ambas variables.*



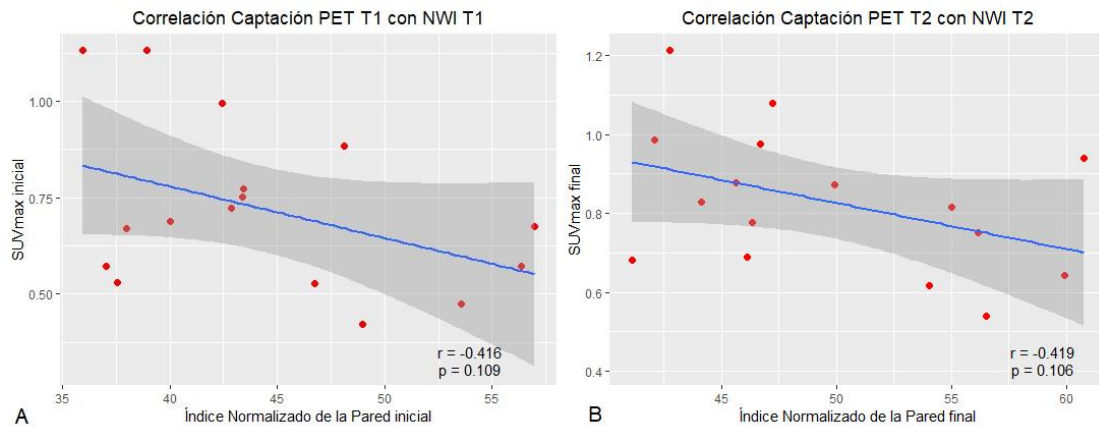
**Figura 34: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de la pared por resonancia, datos agrupados**

Se correlacionaron en conjunto los datos del volumen de pared en la resonancia y la captación máxima en el PET en T1 y T2, sin que exista una correlación significativa ( $r = 0.193$ ,  $p = 0.289$ ).



**Figura 35: Correlación entre la captación en el PET y el grosor máximo de pared por resonancia**

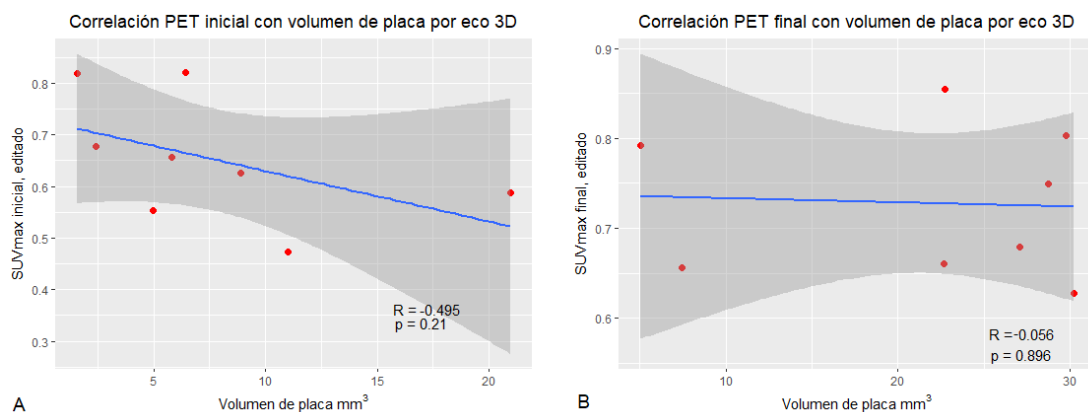
Correlación entre el espesor máximo de la pared aórtica en la resonancia y la captación máxima en el PET. En el estudio inicial (figura A) se observa una tendencia a una correlación negativa, sin ser estadísticamente significativa ( $p = 0.096$ ). En el estudio final no existe correlación entre ambas medidas ( $p = 0.912$ ).



**Figura 36: Correlación entre la captación en el PET y el índice normalizado de la pared (NWI)**

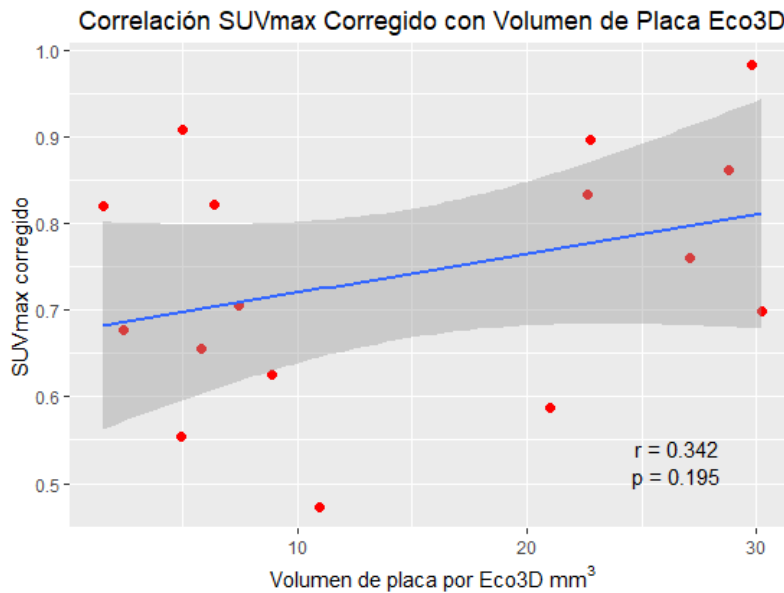
Correlación entre la captación máxima en el PET y el índice normalizado de la pared, tanto en el estudio inicial (figura A) como en el estudio final (figura B). Se observa una tendencia a una correlación negativa, sin ser estadísticamente significativa ( $p = 0.109$  y  $0.106$ , respectivamente).

La correlación con el volumen de placa por ecografía, muestra una ligera tendencia negativa no significativa ( $r = -0.212$  y  $-0.137$ , en la primera y segunda resonancia respectivamente, Figura 37). Al comparar en conjunto el volumen de placa valorado por ecografía 3D en los tiempos estudiados con la captación en el PET sí que existe una correlación positiva ligera, aunque no es estadísticamente significativa ( $r = 0.342$ ,  $p = 0.195$ , Figura 38).



**Figura 37: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de placa por ecografía 3D**

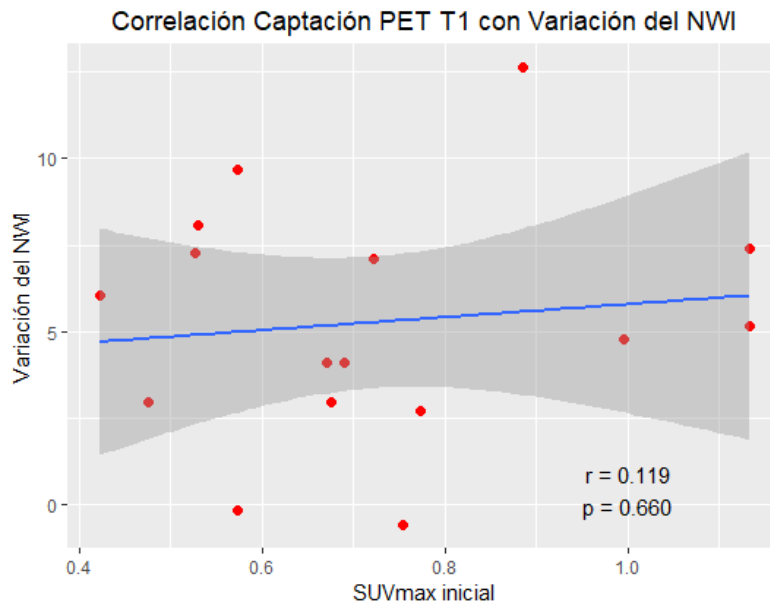
Correlación entre la captación máxima editada en el PET y el volumen de placa medido por ecografía 3D, tanto en el estudio inicial (figura A) como en el estudio final (figura B), sin que exista correlación entre dichas mediciones.



**Figura 38: Correlación entre la captación en el PET y el volumen de placa por ecografía 3D**

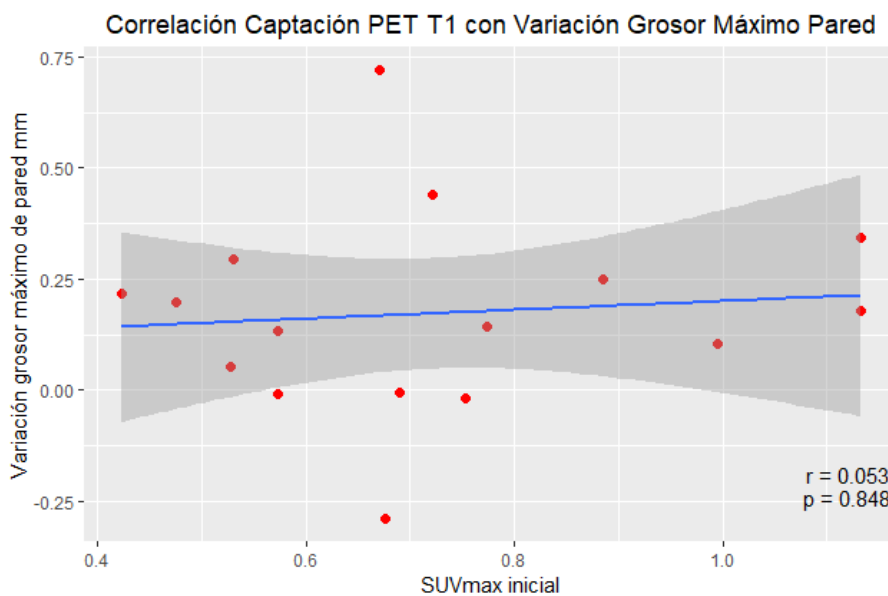
Correlación entre la captación máxima en el PET (corregida) y el volumen de placa medido por ecografía 3D, incluyendo el estudio inicial y final para valorar su relación en conjunto, sin que exista una correlación significativa, aunque se observa un cambio de tendencia hacia una correlación positiva entre mayor volumen de placa y mayor captación.

Se utilizó la captación en el primer PET para comparar con las variaciones anatómicas que se obtuvieron con ecografía 3D y resonancia. No se encontró correlación entre la captación inicial y la variación del índice normalizado de la pared ( $r = 0.119$ ,  $p = 0.660$ , Figura 39), ni con la variación del grosor máximo de la pared ( $r = 0.053$ ,  $p = 0.848$ , Figura 40). En cuanto a la variación del volumen luminal existe una ligera correlación negativa que no es estadísticamente significativa ( $r = -0.342$ ,  $p = 0.195$ , Figura 41). No existe correlación con las variaciones en el volumen de la pared ( $r = 0.044$ ,  $p = 0.871$ , Figura 42). Existe la tendencia a una correlación positiva con la variación del volumen de placa determinada por ecografía vascular 3D, aunque no es estadísticamente significativa ( $r = 0.547$ ,  $p = 0.160$ , Figura 43).



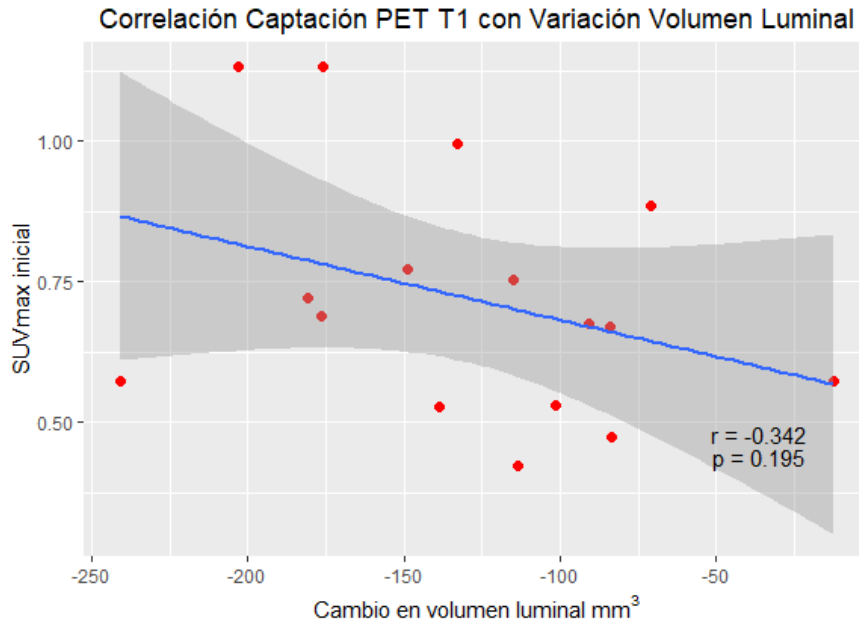
**Figura 39: Correlación entre la captación máxima en el PET inicial y la variación del índice normalizado de la pared (NWI)**

No existe correlación entre la captación máxima en el PET inicial y la variación del NWI entre la primera y la última resonancia magnética ( $p = 0.660$ ).



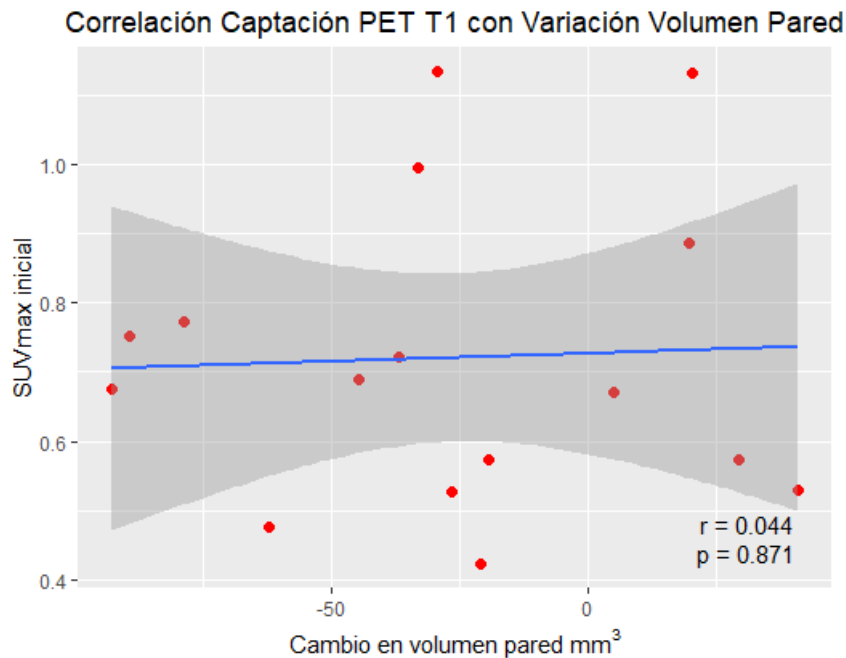
**Figura 40: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el grosor máximo de la pared arterial**

Correlación entre la captación máxima en el PET inicial y la variación del espesor máximo de la pared aórtica medido por resonancia magnética, se observa que el nivel de captación en el primer PET no predice los cambios en el grosor máximo de la pared ( $p = 0.848$ ).



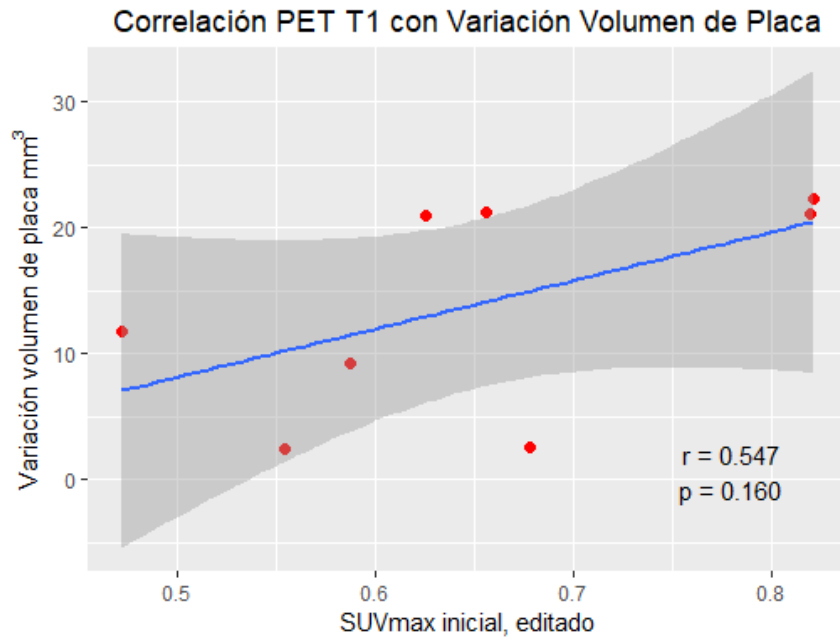
**Figura 41: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el volumen luminal**

Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el volumen luminal medida por resonancia, observándose una tendencia a una mayor pérdida luminal cuando existe una mayor captación inicial ( $r = -0.342$ ,  $p = 0.195$ ).



**Figura 42: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación en el volumen de pared**

Correlación entre la captación máxima en el PET inicial y la variación en el volumen de pared medido por resonancia, sin que exista ninguna correlación ( $r = 0.044$ ,  $p = 0.871$ ).



**Figura 43: Correlación entre la captación en el PET inicial y la variación del volumen de placa por ecografía**

Correlación entre la captación máxima en el PET inicial y la variación del volumen de placa medido por ecografía 3D, existe cierta tendencia a una correlación positiva sin significación estadística ( $p = 0.160$ ).

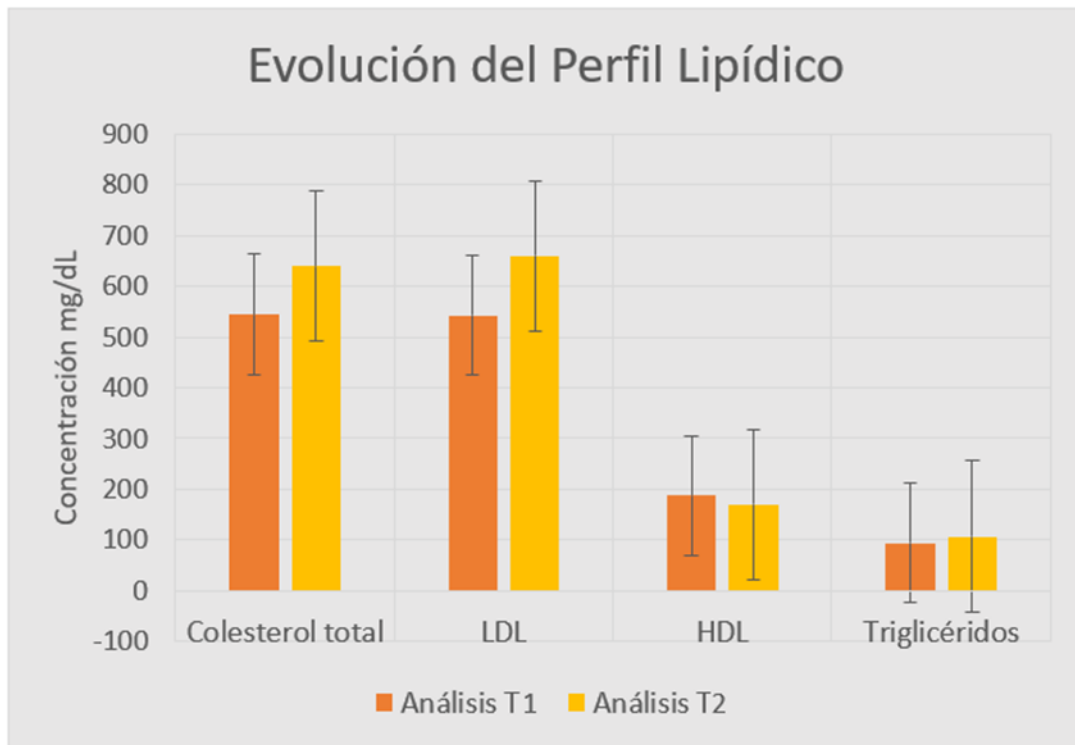
## 5.5. Determinaciones analíticas

Se obtuvieron muestras para determinaciones analíticas de perfil lipídico al momento de hacer la primera y la última resonancia magnética. Los resultados se describen en la Tabla 4. Los valores normales de colesterol en conejos New Zealand White, machos, de 10 semanas se describen entre 13 y 287 mg/dL (101). Los niveles de colesterol total y LDL se encuentran aumentados en la primera determinación. Se observa un incremento no significativo del 17.5% del colesterol total ( $p = 0.071$ ) y un aumento del 21.7% del LDL ( $p = 0.028$ ). Las variaciones de los niveles de HDL y triglicéridos no fueron significativas (Figura 44).

Análisis					
	Análisis T <sub>1</sub> Media ± DE	Análisis T <sub>2</sub> Media ± DE	Diferencia T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>	% de variación	p
Colesterol total	545 ± 257	640 ± 257	95	17.5%	0.071
LDL	542 ± 253	660 ± 242	118	21.7%	0.028
HDL	187 ± 71	170 ± 46	-17	-9.3%	0.507
Triglicéridos	94 ± 35	107 ± 74	13	13.8%	0.572

### **Tabla 4: Determinaciones analíticas iniciales y finales**

*Perfil lipídico realizado a las 18 y las 35 semanas, que muestra los niveles severamente elevados de colesterol, LDL y HDL, con un incremento significativo de la concentración de colesterol LDL entre las dos determinaciones ( $p = 0.028$ ), el colesterol total y los triglicéridos también se incrementan, aunque no es significativa la diferencia ( $p = 0.071$  y  $0.572$  respectivamente). El colesterol HDL sufre una ligera disminución entre las dos determinaciones. Análisis T<sub>1</sub>: muestra de sangre obtenida a las 18 semanas; Análisis T<sub>2</sub>: muestra de sangre obtenida a las 35 semanas; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad.*



**Figura 44: Evolución del perfil lipídico**

*Evolución de los niveles de colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos. Existe un incremento del colesterol del 17.5% que no llega a ser estadísticamente significativo ( $p = 0.071$ ) y un incremento del LDL del 21.7% del LDL que es significativo ( $p = 0.028$ ). Análisis T<sub>1</sub>: muestra de sangre obtenida a las 18 semanas; Análisis T<sub>2</sub>: muestra de sangre obtenida a las 35 semanas; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad.*

## 6. DISCUSIÓN

---

La aterosclerosis subclínica se ha relacionado con un incremento del riesgo de padecer eventos cardiovasculares. El detectar y cuantificar la aterosclerosis en éstos estadios es una necesidad en la medicina actual, para lograr una mejor estadificación del riesgo cardiovascular (30,31). Existen múltiples técnicas de imagen que permiten el estudio de la placa aterosclerótica, aunque actualmente sólo el score de calcio por TAC y la cuantificación de la carga de aterosclerosis por ecografía han demostrado mejorar la valoración del riesgo cardiovascular individual, por encima de las escalas de riesgo habituales (29,51,102).

Las múltiples técnicas de imagen que permiten el estudio de la placa aterosclerótica, evalúan diferentes aspectos de la misma, resultando difícil realizar una comparación directa entre ellas en pacientes, considerando lo costoso tanto en tiempo como en dinero, así como el hecho de someter a los pacientes a radiaciones ionizantes con algunas de las técnicas. Tampoco se conoce la capacidad de las mismas en predecir la progresión de la enfermedad, aunque existen proyectos importantes en seres humanos que se encuentran actualmente en desarrollo (76).

Este trabajo de tesis doctoral, centrado en la valoración de las etapas iniciales de la aterosclerosis, nos ha permitido comparar de forma directa la ecografía vascular 3D, la resonancia magnética y el PET. Para ello hemos utilizado un modelo de aterosclerosis ampliamente utilizado en estudios previos (40,83,84).

En primer lugar hemos utilizado la ecografía vascular tridimensional realizada con una sonda lineal volumétrica, que cuenta con una guía mecánica interna, lo que permite hacer un barrido angular automático y calcular con fiabilidad el volumen de placa tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo placas pequeñas (36). Esta técnica ha demostrado ser útil para detectar la carga aterosclerótica en diferentes territorios vasculares, en estadios tempranos de la enfermedad (37). En nuestro estudio vemos un claro incremento del volumen

de placa de  $7.75 \pm 6.17 \text{ mm}^3$  en la ecografía inicial a  $21.71 \pm 10 \text{ mm}^3$  en la ecografía final, con un crecimiento relativo del 171.6%, resultado notoriamente diferente a lo observado con la resonancia, donde el volumen de la pared disminuyó en un 8,2%, esto demuestra la diferencia que existe entre ambas pruebas; al analizar la resonancia toda la pared del vaso, con el remodelado negativo observado, se observa una disminución del valor total del volumen medido, mientras que la ecografía sólo analiza las placas que protruyen de la pared del vaso (Figura 45). López-Melgar y colaboradores (36) demostraron que existe una alta correlación entre el volumen de placa medido por ecografía 3D con la histología ( $r = 0.998$ ,  $p < 0.001$ ). El volumen de placa presenta una tendencia a correlacionarse con la captación del PET, pero esta no es estadísticamente significativa ( $r = 0.34$ ,  $p = 0.195$ ).

Hemos utilizado la resonancia que permite medir de forma directa el volumen de la pared aórtica y de la luz de la arteria (85,98). Se observa cómo se produce un aumento significativo del volumen de la pared respecto a los controles, que posteriormente disminuye ligeramente en la evolución; así mismo, hay un aumento no significativo del volumen luminal, que posteriormente se reduce. Esta mayor reducción del volumen luminal que de la pared se refleja como un incremento del índice normalizado de la pared, utilizado en varios estudios preclínicos (40–43).

Helft y colaboradores (103) realizaron un estudio con resonancia magnética para valorar la evolución de la aterosclerosis, y su regresión con un modelo de conejo similar al nuestro (salvo la realización de doble denudación endotelial aórtica). El área de pared basal que describen es de  $4.62 \pm 0.09 \text{ mm}^2$ , y un grosor medio de pared de  $0.38 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ , ligeramente menores que los controles de nuestro estudio ( $5.28 \pm 1.32 \text{ mm}^2$  y  $0.41 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ , respectivamente). El área luminal media basal es de  $9.56 \text{ mm}^2$ , comparada con  $11.58 \text{ mm}^2$  en nuestro estudio. A los 9 meses, tiempo similar al T<sub>2</sub> de nuestro estudio, el área de pared es de  $7.59 \pm 0.26 \text{ mm}^2$ , y un grosor medio de pared de  $0.65 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ . Igualmente, son ligeramente menores a lo que registramos en nuestro estudio ( $9.70 \pm 2.35 \text{ mm}^2$  y  $0.71 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ , respectivamente). Respecto al área luminal es de  $8.58 \text{ mm}^2$ , 10% menor que el área basal. En

nuestro caso el área luminal en el T2 es 10.88 mm<sup>2</sup>, 6% menor que en los controles. Sus resultados y los nuestros son similares, las diferencias observadas probablemente se justifican en que ellos utilizaron el segmento de aorta localizado entre las arterias renales y la bifurcación iliaca, mientras que nosotros estudiamos la aorta 4 cm proximal y 4 cm distal a la arteria renal derecha. La resonancia T<sub>1</sub> realizada representa un tiempo intermedio respecto al estudio de Helft, siendo un punto precoz comparado con este estudio.

En el estudio de Worthley y colaboradores (98) describen el remodelado que se produce en la aorta de conejo en el modelo de hipercolesterolemia hereditaria de Watanabe y denudación endotelial. Se realizó una resonancia basal y otra a los 6 meses. La correlación entre la resonancia y la histopatología era buena ( $r = 0.84$ ). Nuestra correlación a nivel del segmento interrenal es ligeramente menor ( $r = 0.74$ ), aunque altamente significativa. A los 6 meses describen un incremento significativo en el área de la pared de  $3.61 \pm 0.07$  mm<sup>2</sup> a  $5.57 \pm 0.09$  mm<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ ) y un incremento ligero en el área luminal, de  $4.36 \pm 0.16$  mm<sup>2</sup> a  $4.89 \pm 0.12$  mm<sup>2</sup> ( $p = 0.006$ ), considerando que existe un aumento de la carga aterosclerótica con remodelado positivo de la pared. Cabe resaltar que estos dos estudios sólo evaluaron la aorta infrarrenal, lo que justifica las áreas descritas sean menores a las obtenidas en nuestro estudio. Si consideramos sólo el segmento infrarrenal para hacerlo comparable con los estudios descritos, el área de la pared en nuestro estudio progresa de 9.12 a 8.18 mm<sup>2</sup>. La luz aórtica progresa de 9.03 a 6.65 mm<sup>2</sup>, siendo la luz aórtica final bastante similar, aunque el área de la pared en nuestro modelo es mayor. La progresión observada, comparada con los dos descritos previamente, concuerda con la teoría de Glagov, de que en los estadios iniciales de la aterosclerosis existe una dilatación de la arteria, con remodelado positivo, que posteriormente progresa a la estenosis luminal (18,19).

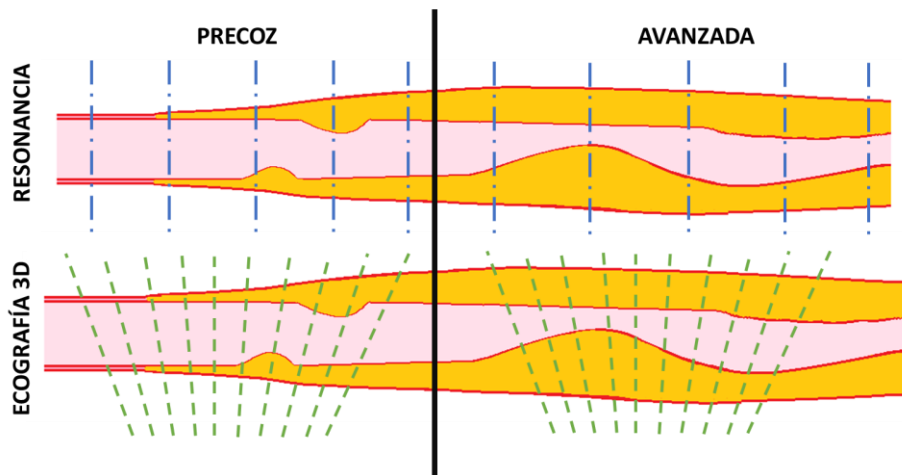
En nuestro estudio evidenciamos que inicialmente se produce un remodelado positivo, con una media de área de la pared de  $10.36 \pm 2.46$  mm<sup>2</sup>, que en la resonancia final es  $9.70 \pm 2.35$  mm<sup>2</sup> ( $p = 0.023$ ), existiendo un progresivo remodelado negativo de la luz del vaso que pasa de una media de

área inicial de  $14.11 \pm 5.56 \text{ mm}^2$  a  $11.58 \pm 3.97 \text{ mm}^2$  ( $p < 0.001$ ), valores muy similares a los descritos por Ibáñez y colaboradores (40).

En cuanto al grosor medio de la pared medido por resonancia en nuestro estudio encontramos un incremento no significativo del 4.4% entre la semana 18 y la semana 35, de  $0.68 \pm 0.08 \text{ mm}$  a  $0.71 \pm 0.05 \text{ mm}$ , incremento similar a lo que describen Chen y colaboradores (104) en su estudio de resonancia describen un 8.9% de incremento en el grosor medio, que pasa de  $0.45 \pm 0.09 \text{ mm}$  a los 3 meses a  $0.49 \pm 0.02 \text{ mm}$  a los 6 meses ( $p = 0.62$ ), aunque los grosores medios son llamativamente menores a los observados en nuestro estudio, diferencia que podría estar en relación con que nosotros hicimos tres pasadas de denudación endotelial, mientras que en este estudio sólo realizaron dos pasadas.

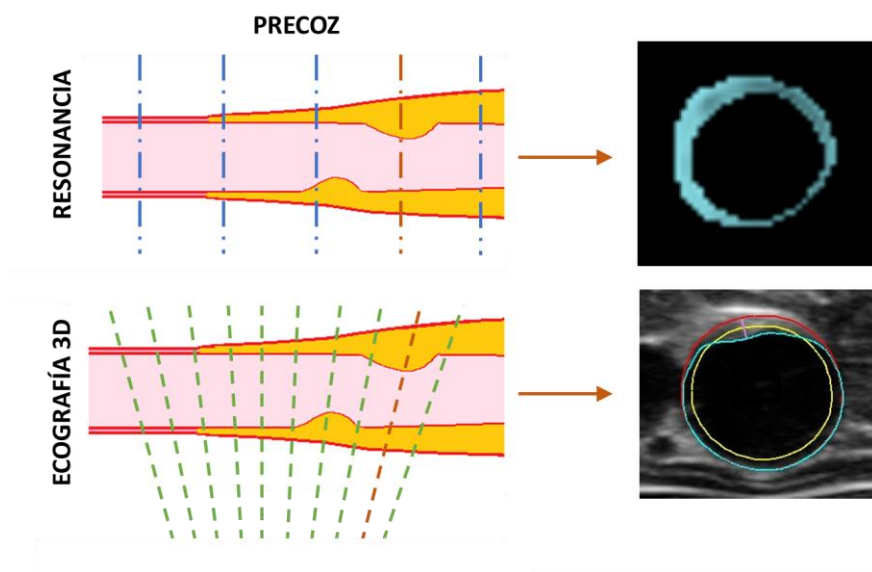
En un estudio realizado en 68 pacientes, a los que previamente se había diagnosticado la presencia de estenosis carotideas entre 50 y 79% por ecografía, se realizó seguimiento de las placas ateroscleróticas con resonancia magnética, observándose una reducción del área de la luz del  $1.9 \pm 6.7\%$ , un crecimiento de la pared del  $2.2 \pm 5.2\%$  y un incremento del NWI del  $1.7 \pm 3.3\%$ , tendencia similar a lo que sucede con el área luminal y el NWI en nuestro estudio (42).

En relación a la poca correlación que existe entre la ecografía vascular 3D y la resonancia, se pueden justificar por las diferencias técnicas de las mismas. La resonancia mide toda la pared arterial, quitándole valor a las placas que sobresalen en la luz arterial; mientras que la ecografía es muy útil para ver las placas que protruyen en la luz arterial, pero no valora la pared arterial, esto se representa esquemáticamente en las Figura 45 y Figura 46.



**Figura 45: Comparación entre la resonancia y la ecografía en lo referente a aterosclerosis precoz y tardía**

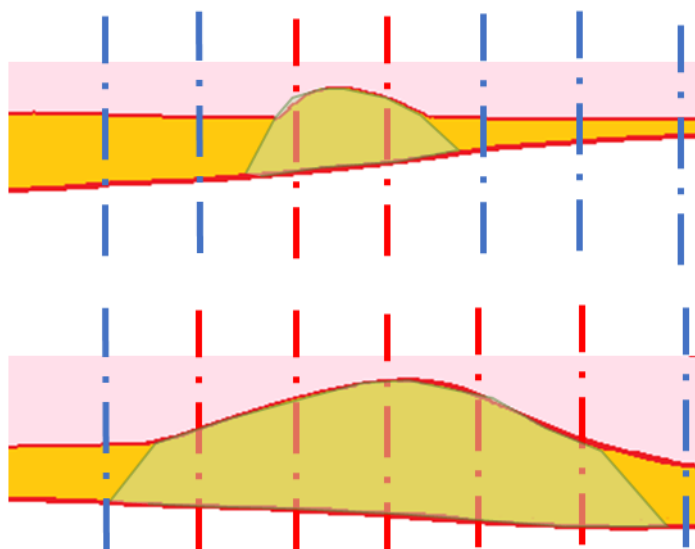
Esquema que muestra las diferencias entre la resonancia magnética y la ecografía vascular 3D al estudiar la aterosclerosis en una fase precoz, comparado con lo que sucede en una fase avanzada de la misma. Con la resonancia se obtienen un número inferior de cortes (líneas azules), y se incluye toda la pared del vaso. Con la ecografía se analizan más cortes, valorando sólo las placas que sobresalen de la pared arterial (líneas punteadas verdes).



**Figura 46: Comparación de las imágenes obtenidas en aterosclerosis precoz, entre la resonancia y la ecografía**

Representación esquemática e imagen obtenida en una zona similar a la representada con la línea roja. En el panel superior se observa un corte de resonancia, y el área analizada corresponde a toda la pared arterial; en el panel inferior se representa un corte de la ecografía donde se aprecia que el análisis se realiza sólo de la placa que protruye en la luz arterial (espacio comprendido entre el contorno verde y rojo).

En la Figura 12 se observa una correlación moderada entre la ecografía y la resonancia al analizar segmentos donde se evidencia placa aterosclerótica por la ecografía y correlacionarlos con la resonancia; dadas las diferencias en el análisis que existen, con placas más grandes por ecografía, con más cortes analizados, también se incluyen más cortes de la resonancia, lo que indudablemente lleva a que el área de pared arterial sea mayor (Figura 47).



**Figura 47: Representación esquemática de la medición de placas ateroscleróticas de diferente tamaño con ecografía y resonancia**

Sombreado en verde se representa el área de la placa aterosclerótica medida con ecografía vascular 3D. Las líneas punteadas representan los cortes de la resonancia, resaltados en rojo los cortes que coinciden con la localización de la placa determinada por ecografía. En el panel superior se representa una placa pequeña que se relaciona con dos cortes de resonancia; en el panel inferior una placa grande que se relaciona con 5 cortes de resonancia y mayor área de pared.

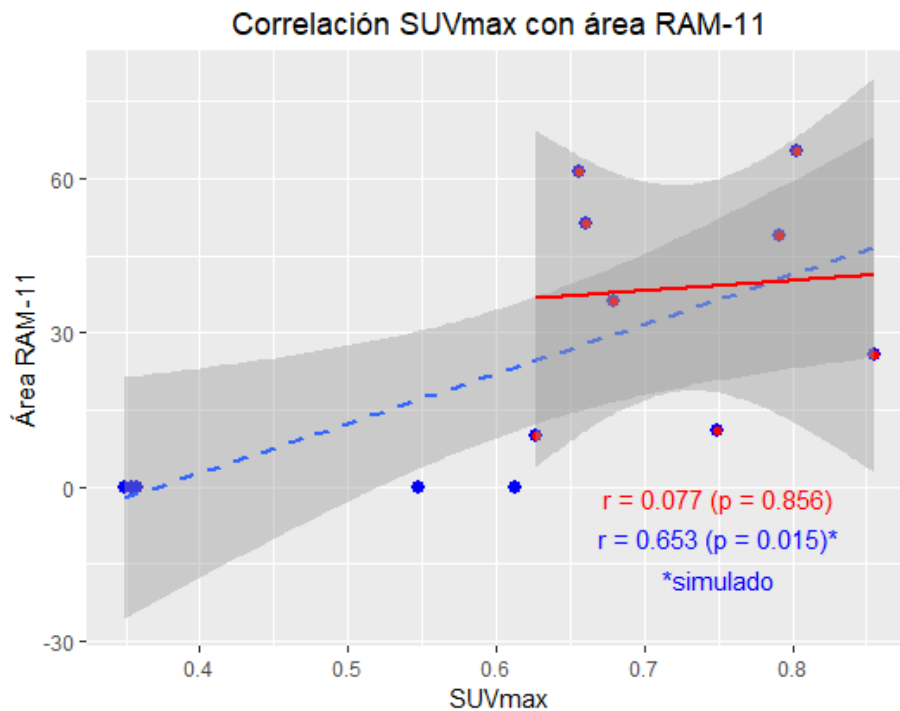
La tomografía por emisión de positrones con  $^{18}\text{F}$ -FDG se ha utilizado para cuantificar la actividad inflamatoria de las placas ateroscleróticas, correlacionándolo con la presencia de macrófagos (105). El riesgo de ruptura de la placa aterosclerótica se encuentra más en correlación con la composición de la placa que con su tamaño (72). La deoxiglucosa y el  $^{18}\text{F}$ -FDG son análogos de la glucosa y compiten con ella para ser captados por células metabólicamente activas, el  $^{18}\text{F}$ -FDG se acumula en estas células y sirve como medida de la actividad metabólica de las mismas.

En nuestro estudio hemos estudiado la progresión de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG y su correlación con la variación anatómica de la aterosclerosis. Se objetiva una captación significativamente mayor respecto a los controles, con un incremento progresivo de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG a lo largo del estudio (SUVmean de  $0.53 \pm 0.16$  a  $0.60 \pm 0.13$ ; SUVmax de  $0.72 \pm 0.24$  a  $0.83 \pm 0.17$ ), sin que las diferencias lleguen a ser estadísticamente significativas ( $p = 0.103$  para SUVmean), los valores son ligeramente menores a los descritos por Zhao *y colaboradores* (64) que describe la evolución de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en un aorta de conejo, que da valores basales de SUVmean y SUVmax  $0.45 \pm 0.11$  y  $0.55 \pm 0.13$ , a las 8 semanas  $0.69 \pm 0.12$  y  $0.75 \pm 0.13$  y a las 18 semanas de  $0.79 \pm 0.12$  y  $0.86 \pm 0.14$ . Mateo *y colaboradores* (61) describen un SUVmean basal de  $0.35 \pm 0.02$  y de  $0.43 \pm 0.02$  después de la inducción de la aterosclerosis. Lobbato *y colaboradores* (106) describen en conejos NZW una captación media basal bastante menor, de  $0.23 \pm 0.03$ , y de  $0.65 \pm 0.03$  en conejos con aterosclerosis. Se realizaron análisis para demostrar la adecuada concordancia entre SUVmax y SUVmean, y las diferencias con los valores corregidos estadísticamente, que principalmente alteraron un valor del SUVmax en el PET inicial, sin cambios significativos en los otros estudios.

Se realizaron análisis en busca de correlaciones de la captación del PET con medidas anatómicas. No se observó ninguna correlación entre la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG con el volumen de la pared ni con el índice normalizado de la pared estudiados por resonancia. Tampoco se encontró correlación con el volumen de placa medido por ecografía. La confirmación de estos hallazgos se hizo con la histología, que no mostró relación entre el área de la pared y la captación del PET final, datos compatibles con otros estudios (107). Un estudio reciente en el que se realizó PET/RM a adultos con aterosclerosis demostrada por ecografía, mostró escasa correlación entre el número de placas y la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $r = 0.25$ ), siendo la mayoría de captaciones (61.5%) en segmentos arteriales libres de placa, sólo el 11% de las placas tenían captación coincidente (65).

En nuestro estudio no se encontró correlación entre la captación del PET y la presencia de macrófagos determinada por la tinción RAM-11 ( $r = 0.18$ ,

$p = 0.62$ ). En el caso del estudio de Zhao y colaboradores (105) encontraron una correlación moderada ( $r = 0.48$ ,  $p < 0.0001$ ) entre la captación del PET y la presencia de macrófagos determinada con la tinción de RAM-11; a diferencia de nuestro estudio, incluyeron un 33% de animales control basal en el análisis, que tienen menor captación y ausencia de macrófagos en la pared aórtica. En el estudio de Vucic y colaboradores (108), donde demostraron que la pioglitazona disminuye la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, también describen una correlación entre la captación en el PET y la tinción de RAM-11; para realizar esta correlación incluyen tres conejos control, con ausencia de macrófagos en la pared arterial. Si realizamos un análisis hipotético, incluyendo la captación del PET de los cuatro conejos control, asumiendo ausencia de macrófagos en la pared aórtica como se describe en otros estudios (63,108,109), obtenemos una correlación significativa entre la captación del PET y la tinción de RAM-11 ( $r = 0.653$ ,  $p = 0.015$ , Figura 48). En otro estudio realizado en conejos NZW con un modelo similar al nuestro, en el que también describen correlación entre la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG y RAM-11, las mediciones las realizaron *ex-vivo* con un contador gamma, directamente en la aorta aislada (63); otro detalle interesante en este estudio es la captación significativamente mayor que existe en zonas donde se ha realizado denudación endotelial, respecto a otros territorios.



**Figura 48: Correlación de la captación del PET con el área de la tinción de RAM-11**

En azul se representan los datos de la captación del PET incluyendo los conejos control. Al hacer la correlación con la tinción de RAM-11, asumiendo ausencia de macrófagos en la pared aórtica en los controles, como se describe en otros estudios (63,109), se obtiene una correlación significativa ( $r = 0.653$ ,  $p = 0.015$ ). En rojo las mediciones realizadas en nuestro estudio, sin que se observe una correlación significativa ( $r = 0.077$ ,  $p = 0.856$ ).

Zhao y colaboradores (64) realizaron un estudio con el modelo de aterosclerosis de conejo (dieta con colesterol 1.5% y denudación aórtica), en el que objetivan una elevación progresiva de la captación de FDG, siendo mayor en los conejos con mayor riesgo de ruptura de la placa. Así mismo describen una correlación moderada ( $r = 0.413$ ,  $p = 0.002$  para SUVmax, y  $r = 0.386$ ,  $p = 0.005$  para SUVmean) entre la captación del PET y la presencia de macrófagos con tinción CD-14 en su estudio, con 22 conejos analizados.

La resolución espacial de las imágenes reconstruidas es baja comparada con el tamaño de las zonas de hipercaptación, lo que independientemente del tipo de reconstrucción lleva a infraestimar el grado de captación (110). Considerando estas características y los resultados obtenidos podemos decir que la captación en el PET es útil para determinar la presencia de actividad inflamatoria, donde van incluidos los macrófagos, en la pared aórtica, pero no es lo suficientemente sensible y específica para mostrar una

correlación significativa entre la cantidad de macrófagos presentes en el tejido y el grado de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG.

En otro estudio, realizado en conejos con hiperlipidemia hereditaria de Watanabe, por Ogawa y colaboradores (109), evaluaron la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en la aorta de los conejos, siendo mayor en la aorta torácica que en la abdominal, evidenciando una mayor infiltración de macrófagos en dicha región. Describen una alta correlación entre el recuento de macrófagos y la captación del de  $^{18}\text{F}$ -FDG con un contador de radioisótopos *ex-vivo* ( $r = 0.81$ ,  $p < 0.0001$ ), en este mismo estudio, también describen que observan zonas con gran cantidad de macrófagos y escasa captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Utilizaron conejos New Zealand White de control, observando ausencia de macrófagos en la pared de la aorta sana, teniendo una captación muy baja en el PET. No se encontró relación entre el número de macrófagos y el grosor de la íntima.

En el estudio realizado por Mateo y colaboradores (61) evaluaron la aterosclerosis en aorta de conejo con un modelo similar al nuestro, aunque a más largo plazo, analizando la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG y de  $^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazol ( $^{18}\text{F}$ -FMISO), un radiotrazador que permite detectar zonas de hipoxia tisular. La captación de  $^{18}\text{F}$ -FMISO se incrementó progresivamente durante todo el estudio, con una alta correlación con la tinción de pimonidazol, específica para hipoxia. La captación media de  $^{18}\text{F}$ -FDG era mayor que en los controles, pero permaneció estable a lo largo del estudio. Además, encontraron una intensa correlación entre las áreas hipóxicas y la presencia de macrófagos determinada por la tinción de RAM-11 ( $r = 0.87$ ,  $p < 0.0001$ ), sugiriendo que la captación puede estar más en relación con la hipoxia dentro de la placa que con la actividad inflamatoria de la misma. Folco y colaboradores (60) realizaron un estudio *in vitro* donde demostraron que la captación de glucosa era mayor en macrófagos sometidos a hipoxia que en macrófagos estimulados con citoquinas proinflamatorias.

Son pocos los estudios que se han centrado en cambios anatómicos con relación a la captación en el PET, y la mayoría se han focalizado en placas complicadas. En nuestro estudio, al analizar las correlaciones entre las medidas anatómicas realizadas y la captación del PET, con la intención de

valorar su capacidad de predecir la progresión de la enfermedad, observamos que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG no se correlacionó con el crecimiento de la pared aórtica por resonancia. Se observó una correlación moderada entre la captación inicial y el aumento de placa determinado por ecografía 3D, aunque no alcanzó la significación estadística ( $r = 0.547$ ,  $p = 0.160$ ). Un sub-estudio con 42 pacientes del ensayo clínico dal-PLAQUE (estudio fase 2b que evaluaba el efecto de dalcetrapib en las características inflamatorias y estructurales de la aterosclerosis), donde se realizaron PET a los 0 y 6 meses; y RM a los 0 y 24 meses, a pacientes con aterosclerosis carotídea, se objetivó que el aumento de la captación en el PET a 6 meses se correlacionaba con un mayor crecimiento de la placa aterosclerótica a dos años; sin embargo, ni la captación en el PET inicial, ni la variación de la captación entre los 0 y 3 meses (dato disponible en 41 de los 42 pacientes) se correlacionó con la progresión de la aterosclerosis (111), estos últimos datos concuerdan con nuestro estudio. Es posible que las diferencias con nuestros resultados radiquen en el tiempo transcurrido entre las pruebas, que en el ensayo clínico se realizaron PET basal y a los 6 meses, y resonancia basal y a los 2 años, mientras que nosotros hicimos tanto el PET como la RM a los 4 y 8 meses, en fases muy precoces de la enfermedad. Existe también una tendencia a una mayor pérdida del volumen luminal a mayor captación en el PET inicial ( $r = 0.342$ ,  $p = 0.195$ ).

Un estudio retrospectivo de 94 pacientes que tenían 2 PET-CT realizados, en la mayoría de casos como seguimiento de enfermedades oncológicas, con una diferencia promedio de 14.5 meses, en este tiempo observaron una tendencia a la disminución de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en la mayoría de territorios vasculares (-2.07%) con un incremento del volumen de pared calcificada detectada por TC del 15.4% y una disminución del área luminal aórtica (-1.07%) y carotídea (-10.5%) (112), comportamiento similar al que presenta la aorta de conejo en nuestro estudio. La captación del PET sólo se correlacionó con la pérdida luminal aórtica, tendencia que observamos en nuestro estudio (Figura 41). Los autores justifican sus hallazgos en que la inflamación es un evento precoz en la fisiopatología de la enfermedad y que en estos pacientes ya se está valorando una etapa más tardía de la aterosclerosis.

Rudd y colaboradores (62) realizaron el co-registro de PET-FDG y angioCT carotídea en 8 pacientes con estenosis de al menos 70% de la carótida interna y un ataque isquémico transitorio (AIT), comparando el lado de la arteria sintomática con el contralateral, las 8 placas sintomáticas mostraban captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, así como 6 placas asintomáticas, la captación era un 27% mayor en las placas sintomáticas que en las contralaterales. En otro estudio por el mismo grupo (113), comparando el PET con resonancia magnética de alta resolución de carótidas, en pacientes con un AIT reciente, encontraron placas con alta captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, en la arteria responsable del AIT, sin que exista estenosis significativa, lo que va en relación con nuestro estudio, que el volumen de la placa no se correlaciona con la captación de FDG. Otro estudio en humanos, Okane y colaboradores (114), estudiaron diferentes territorios arteriales de 15 pacientes con AIT, con  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET y RM. Observaron que la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en la carótida responsable era mayor que en la vena cava, pero sin diferencias significativas con la carótida contralateral; así mismo, evidenciaron en 14 de 15 pacientes captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG elevada en el origen de ramas laterales, donde suelen formarse placas ateroscleróticas, pero sin que existiesen placas visibles.

## 7. LIMITACIONES

---

Nuestro estudio se diseñó para evaluar cambios de aterosclerosis incipiente y muchos de los hallazgos observados pueden variar con la progresión de la aterosclerosis en el tiempo, por lo que nuestros resultados no son extrapolables a aterosclerosis avanzada.

Aunque consideramos los tres meses de iniciado el estudio como un momento precoz de la aterosclerosis para la realización de las pruebas de imagen, buscando un equilibrio respecto al daño agudo que se produce por la denudación endotelial, datos recientes del estudio PESA (65) muestran captación en la pared arterial sin evidencia de placa aterosclerótica, sugerirían que el PET se debería realizar más precozmente en este modelo o utilizar un modelo con dieta hipercolesterolémica sin denudación endotelial que genera aterosclerosis pero en plazos más prolongados (82).

No se adquirieron imágenes basales de los animales estudiados, la comparación es con imágenes de animales diferentes. El estudio se realizó en un espacio temporal relativamente estrecho, que muestra la evolución de la aterosclerosis en una etapa temprana, en el que las variaciones pueden ser pequeñas, y no podemos determinar correctamente la evolución a largo plazo de la misma, ni la utilidad de las pruebas en un seguimiento más prolongado.

Al utilizar técnicas de imagen diferentes, con resolución y capacidad de adquisición diferente, existe cierta dificultad en lograr una adecuada co-localización entre las mismas. Se utilizaron referencias anatómicas constantes, especialmente las arterias renales, para disminuir esta limitación, aunque no se puede descartar pequeños desfases entre las diferentes técnicas, especialmente en lo que se refiere a la histología, en la que se analizan cortes histológicos finos en puntos determinados.

El análisis de la captación en el PET se puede ver influenciada por la captación que presentan los órganos adyacentes, especialmente las asas

intestinales. Se aplicó un método estadístico para su corrección. Las diferencias encontradas tras la corrección no fueron significativas.

La población estudiada puede ser insuficiente para detectar diferencias estadísticamente significativas, especialmente en lo referente a la ecografía y la captación en el PET.

En cuanto a la composición de las placas ateroscleróticas no se realizaron tinciones específicas, por lo que no se puede comparar la influencia que tiene su composición con las diferentes imágenes obtenidas y la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG.

Una limitación inherente a todos los trabajos que utilizan la histología para realizar mediciones, en relación con la retracción que sufren las muestras histológicas durante su procesado, en el caso de vasos con escasa enfermedad la fijación no produce grandes cambios, pero el procesado de la muestra produce una reducción importante del área luminal, aunque sin afectar significativamente el área de la pared (115), siendo nuestro modelo principalmente de aterosclerosis incipiente con volúmenes de placa pequeños, por lo que la retracción que afecte las mediciones de pared por histología debe ser pequeña. Aun así, no se puede descartar cierto efecto de retracción ya que el efecto de la fijación no fue evaluado en nuestras muestras.

En la evaluación inmunohistoquímica se utilizó RAM-11, un anticuerpo monoclonal contra los macrófagos de conejo, lo cual le da alta especificidad para determinar la presencia de macrófagos en el corte estudiado, pero no permite evaluar la viabilidad ni la actividad de esos macrófagos, aún así es uno de los métodos de referencia utilizados en múltiples estudios en conejos.

## 8. CONCLUSIONES

---

1. En un modelo de aterosclerosis en conejo inducida con dieta grasa y denudación endotelial, la ecografía vascular tridimensional permite detectar y cuantificar la aterosclerosis precoz en territorio de aorta abdominal, así como cuantificar el volumen de placa aterosclerótica (y por tanto sus cambios) con mayor precisión que la resonancia magnética.
2. La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en aorta abdominal evaluada mediante PET es significativamente más elevada en conejos que ha recibido una dieta rica en grasa que en aquellos que han recibido dieta control.
3. La captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en aorta abdominal evaluada mediante PET no está correlacionada con el volumen ni con el grosor de pared arterial. Esta ausencia de correlación existe cuando la pared arterial se cuantifica por ecografía vascular tridimensional, por resonancia magnética o por histología.
4. La intensidad de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en aorta abdominal evaluada mediante PET no se asocia con la tasa de crecimiento de las placas ateroscleróticas cuantificada tanto mediante ecografía vascular tridimensional como mediante resonancia magnética.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. WHO | The top 10 causes of death [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [cited 2019 Jun 11]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci*. 2018 Jun 29;132(12):1243–52.
3. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, et al. Prevalence, vascular distribution, and multiterritorial extent of subclinical atherosclerosis in a middle-aged cohort the PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) study. *Circulation*. 2015;131(24):2104–13.
4. Lusis A. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–41.
5. Libby P. The Vascular Biology of Atherosclerosis. In: Bonow R, Mann D, Zipes D, Libby P, editors. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 9th editio. Elsevier Inc; 2012. p. 873–90.
6. Willems S, Vink A, Bot I, Quax PHA, de Borst GJ, de Vries J-PPM, et al. Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(48):3699–706.
7. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jan;76(1):333–7.
8. Sakai A, Kume N, Nishi E, Tanoue K, Miyasaka M, Kita T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Feb;17(2):310–6.
9. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2292–301.

10. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci.* 1971 Feb 16;177(1046):109–59.
11. Gimbrone MA, García-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2013 Jan 1;22(1):9–15.
12. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Figueiredo J, Gorbатов R, et al. Local proliferation domina. 2014;19(9):1166–72.
13. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000 Mar;247(3):349–58.
14. Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2014 Jan;47(1):1–7.
15. Lee W-C, Chiang Y-J, Wang H-C, Jeng L-B, Chen M-F, Lu L, et al. FasL-transduced muscular cells induce apoptosis of activated T-lymphocytes. *Transplant Proc.* 2003 Feb;35(1):569–70.
16. Kavurma MM, Tan NY, Bennett MR. Death Receptors and Their Ligands in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Oct;28(10):1694–702.
17. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111(25):3481–8.
18. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *N Engl J Med.* 1987 May 28;316(22):1371–5.
19. Armstrong ML, Heistad DD, Marcus ML, Megan MB, Piegors DJ. Structural and hemodynamic response of peripheral arteries of macaque monkeys to atherogenic diet. *Arterioscler An Off J Am Hear Assoc Inc.* 2011;5(4):336–46.
20. Jaipersad AS, Lip GYH, Silverman S, Shantsila E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(1):1–11.
21. Campbell IC, Suever JD, Timmins LH, Veneziani A, Vito RP, Virmani R, et al. Biomechanics and Inflammation in Atherosclerotic Plaque Erosion and Plaque Rupture: Implications for Cardiovascular Events in Women.

- Aikawa E, editor. PLoS One. 2014 Nov 3;9(11):e111785.
22. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017 Jan 6;120(1):229–43.
  23. Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*. 1990 Sep;82(3 Suppl):II38-46.
  24. Lombardo A, Rizzello V, Natale L, Lombardi M, Coli S, Snider F, et al. Magnetic resonance imaging of carotid plaque inflammation in acute coronary syndromes: A sign of multisite plaque activation. *Int J Cardiol*. 2009;136(1):103–5.
  25. Fordjour PA, Wang Y, Shi Y, Agyemang K, Akinyi M, Zhang Q, et al. Possible mechanisms of C-reactive protein mediated acute myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*. 2015 Aug 5;760:72–80.
  26. Eicher JD, Wakabayashi Y, Vitseva O, Esa N, Yang Y, Zhu J, et al. Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. *Platelets*. 2016 Apr 2;27(3):230–9.
  27. Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circ J Am Hear Assoc*. 1994;2462–78.
  28. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355–74.
  29. Baber U, Mehran R, Sartori S, Schoos MM, Sillesen H, Muntendam P, et al. Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the BioImage study. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 24;65(11):1065–74.
  30. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2016 Oct;69(10):939.

31. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014 Jun 24;129(25 Suppl 2):S49-73.
32. Barratt DC, Davies AH, Hughes AD, Thom SA, Humphries KN. Accuracy of an electromagnetic three-dimensional ultrasound system for carotid artery imaging. *Ultrasound Med Biol*. 2001 Oct;27(10):1421–5.
33. Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation*. 1999 Aug 31;100(9):951–7.
34. Kawasaki M, Takatsu H, Noda T, Ito Y, Kunishima A, Arai M, et al. Noninvasive quantitative tissue characterization and two-dimensional color-coded map of human atherosclerotic lesions using ultrasound integrated backscatter: comparison between histology and integrated backscatter images. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Aug;38(2):486–92.
35. Joakimsen O, Børnaa KH, Stensland-Bugge E. Reproducibility of ultrasound assessment of carotid plaque occurrence, thickness, and morphology. The Tromsø Study. *Stroke*. 1997 Nov;28(11):2201–7.
36. López-Melgar B, Fernández-Friera L, Sánchez-González J, Vilchez JP, Cecconi A, Mateo J, et al. Accurate quantification of atherosclerotic plaque volume by 3D vascular ultrasound using the volumetric linear array method. *Atherosclerosis*. 2016 May;248:230–7.
37. López-Melgar B, Fernández-Friera L, Oliva B, García-Ruiz JM, Peñalvo JL, Gómez-Talavera S, et al. Subclinical Atherosclerosis Burden by 3D Ultrasound in Mid-Life. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jul 18;70(3):301–13.
38. Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NPJ. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg*. 2007 Jan;45(1):155–9.
39. Owen DR, Shalhoub J, Miller S, Gauthier T, Doryforou O, Davies AH, et al. Inflammation within carotid atherosclerotic plaque: assessment with

- late-phase contrast-enhanced US. *Radiology*. 2010 May;255(2):638–44.
40. Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, Speidl WS, Pinero A, Choi BG, et al. Rapid Change in Plaque Size, Composition, and Molecular Footprint After Recombinant Apolipoprotein A-IMilano (ETC-216) Administration. Magnetic Resonance Imaging Study in an Experimental Model of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(11):1104–9.
  41. Taylor E, Huang N, Bodde J, Ellison A, Killiany R, Bachschmid MM, et al. MRI of atherosclerosis and fatty liver disease in cholesterol fed rabbits. *J Transl Med*. 2018 Dec 1;16(1):215.
  42. Saam T, Yuan C, Chu B, Takaya N, Underhill H, Cai J, et al. Predictors of carotid atherosclerotic plaque progression as measured by noninvasive magnetic resonance imaging. *Atherosclerosis*. 2007 Oct;194(2):e34-42.
  43. Choi BG, Novoselsky CA, Vilahur G, Viles-Gonzalez JF, Zafar MU, Ibanez B, et al. Validation Study of a Semi-Automated Program for Quantification of Atherosclerotic Burden. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2007 May;9(3):615–20.
  44. Soloperto G, Casciaro S. Progress in atherosclerotic plaque imaging. *World J Radiol*. 2012;4(8):353–71.
  45. Kwee RM, van Oostenbrugge RJ, Prins MH, Ter Berg JWM, Franke CL, Korten AGGC, et al. Symptomatic patients with mild and moderate carotid stenosis: plaque features at MRI and association with cardiovascular risk factors and statin use. *Stroke*. 2010 Jul;41(7):1389–93.
  46. Sirol M, Itskovich V V, Mani V, Aguinaldo JGS, Fallon JT, Misselwitz B, et al. Lipid-rich atherosclerotic plaques detected by gadofluorine-enhanced in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23):2890–6.
  47. Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol*. 2007 May 8;49(18):1860–70.
  48. Motoyama S, Sarai M, Harigaya H, Anno H, Inoue K, Hara T, et al. Computed Tomographic Angiography Characteristics of Atherosclerotic

- Plaques Subsequently Resulting in Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1):49–57.
49. Valenti V, Ó Hartaigh B, Heo R, Cho I, Schulman-Marcus J, Gransar H, et al. A 15-Year Warranty Period for Asymptomatic Individuals Without Coronary Artery Calcium: A Prospective Follow-Up of 9,715 Individuals. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015 Aug;8(8):900–9.
  50. Sibley C, Blumenthal RS, Merz CNB, Mosca L, Bairey Merz CN, Mosca L. Limitations of Current Cardiovascular Disease Risk Assessment Strategies in Women. *J Women's Heal*. 2006 Jan;15(1):54–6.
  51. Berry JD, Liu K, Folsom AR, Lewis CE, Carr JJ, Polak JF, et al. Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the coronary artery risk development in young adults study and multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009 Jan 27;119(3):382–9.
  52. Puri R, Nicholls SJ, Shao M, Kataoka Y, Uno K, Kapadia SR, et al. Impact of Statins on Serial Coronary Calcification During Atheroma Progression and Regression. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Apr 7;65(13):1273–82.
  53. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RAP, Brown AJ, Tawakol A, et al. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):750–69.
  54. Wu Y-W, Kao H-L, Chen M-F, Lee B-C, Tseng W-YI, Jeng J-S, et al. Characterization of plaques using 18F-FDG PET/CT in patients with carotid atherosclerosis and correlation with matrix metalloproteinase-1. *J Nucl Med*. 2007 Feb;48(2):227–33.
  55. Kim H-J, Oh M, Moon DH, Yu K-H, Kwon SU, Kim JS, et al. Carotid inflammation on <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography associates with recurrent ischemic lesions. *J Neurol Sci*. 2014 Dec 15;347(1–2):242–5.
  56. Moustafa RR, Izquierdo-Garcia D, Fryer TD, Graves MJ, Rudd JHF, Gillard JH, et al. Carotid Plaque Inflammation Is Associated With Cerebral Microembolism in Patients With Recent Transient Ischemic Attack or Stroke: A Pilot Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010 Sep 1;3(5):536–41.

57. Tarkin JM, Joshi FR, Rudd JHF. PET imaging of inflammation in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(8):443–57.
58. Lederman RJ, Raylman RR, Fisher SJ, Kison P V, San H, Nabel EG, et al. Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nucl Med Commun*. 2001 Jul;22(7):747–53.
59. Tawakol A, Migrino R, Hoffmann U, Abbara S, Houser S, Gewirtz H, et al. Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Nucl Cardiol*. 2005 May;12(3):294–301.
60. Folco EJ, Sheikine Y, Rocha VZ, Christen T, Shvartz E, Sukhova GK, et al. Hypoxia but not inflammation augments glucose uptake in human macrophages: Implications for imaging atherosclerosis with 18fluorine-labeled 2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Aug 2;58(6):603–14.
61. Mateo J, Izquierdo-Garcia D, Badimon JJ, Fayad ZA, Fuster V. Noninvasive Assessment of Hypoxia in Rabbit Advanced Atherosclerosis Using 18 F-fluoromisonidazole Positron Emission Tomographic Imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014 Mar 1;7(2):312–20.
62. Rudd JHF, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation*. 2002 Jun 11;105(23):2708–11.
63. Tawakol A, Migrino RQ, Bashian GG, Bedri S, Vermylen D, Cury RC, et al. In vivo 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Nov 7;48(9):1818–24.
64. Zhao QM, Zhao XC, Feng TT, Zhang MD, Zhuang XC, Zhao XC, et al. Monitoring of atherosclerosis evolution by detection of inflammatory states of aortae in a rabbit model using 18F-FDG -PET/CT. *Q J Nucl Med Mol imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med [and] Int Assoc Radiopharmacol (IAR), [and] Sect Soc Radiopharm*. 2014 Dec;58(4):440–50.

65. Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, Oliva B, Sánchez-González J, Macías A, et al. Vascular Inflammation in Subclinical Atherosclerosis Detected by Hybrid PET/MRI. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Apr;73(12):1371–82.
66. Cocker MS, Mc Ardle B, Spence JD, Lum C, Hammond RR, Ongaro DC, et al. Imaging atherosclerosis with hybrid [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging: what Leonardo da Vinci could not see. *J Nucl Cardiol*. 2012 Dec;19(6):1211–25.
67. Ishii H, Nishio M, Takahashi H, Aoyama T, Tanaka M, Toriyama T, et al. Comparison of atorvastatin 5 and 20 mg/d for reducing F-18 fluorodeoxyglucose uptake in atherosclerotic plaques on positron emission tomography/computed tomography: a randomized, investigator-blinded, open-label, 6-month study in Japanese adults scheduled. *Clin Ther*. 2010 Dec;32(14):2337–47.
68. Brix G, Lechel U, Glatting G, Ziegler SI, Münzing W, Müller SP, et al. Radiation exposure of patients undergoing whole-body dual-modality 18F-FDG PET/CT examinations. *J Nucl Med*. 2005 Apr 1;46(4):608–13.
69. Lichtlen PR, Nikutta P, Jost S, Deckers J, Wiese B, Rafflenbeul W. Anatomical progression of coronary artery disease in humans as seen by prospective, repeated, quantitated coronary angiography. Relation to clinical events and risk factors. The INTACT Study Group. *Circulation*. 1992 Sep;86(3):828–38.
70. Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, Aretz HT, Jang I-K, Schlendorf KH, et al. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(13):1640–5.
71. Tearney GJ, Yabushita H, Houser SL, Aretz HT, Jang I-K, Schlendorf KH, et al. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. *Circulation*. 2003 Jan 7;107(1):113–9.
72. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):775–8.
73. Mintz GS, Nissen SE, Anderson WD, Bailey SR, Erbel R, Fitzgerald PJ,

- et al. American College of Cardiology clinical expert consensus document on standards for acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound studies (ivus). *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(5).
74. Siegel RJ, Ariani M, Fishbein MC, Chae JS, Park JC, Maurer G, et al. Histopathologic validation of angioscopy and intravascular ultrasound. *Circulation*. 1991 Jul;84(1):109–17.
  75. Kearney P, Erbel R, Rupprecht HJ, Ge J, Koch L, Voigtländer T, et al. Differences in the morphology of unstable and stable coronary lesions and their impact on the mechanisms of angioplasty. An in vivo study with intravascular ultrasound. *Eur Heart J*. 1996 May;17(5):721–30.
  76. Fernández-Ortiz A, Jiménez-Borreguero LJ, Peñalvo JL, Ordovés JM, Moco-roa A, Fernández-Friera L, et al. The progression and early detection of subclinical atherosclerosis (PESA) study: Rationale and design. *Am Heart J*. 2013 Dec;166(6):990–8.
  77. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Mar 17;
  78. Grundy SM, Stone NJ. 2018 American Heart Association/American College of Cardiology Multisociety Guideline on the Management of Blood Cholesterol. *JAMA Cardiol*. 2019 May 1;4(5):488.
  79. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:497841.
  80. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug;27(8):1706–21.
  81. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Atherosclerosis and thrombosis: Insights from large animal models. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.
  82. Constantinides P, Booth J, Carlson G. Production of advanced cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Arch Pathol*. 1960 Dec;70:712–24.

83. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Dec;32(7):2057–64.
84. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation*. 2002 Sep 10;106(11):1390–6.
85. Helft G, Worthley SG, Fuster V, Zaman AG, Schechter C, Osende JI, et al. Atherosclerotic aortic component quantification by noninvasive magnetic resonance imaging: an in vivo study in rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(4):1149–54.
86. Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, White FC, Longhurst JC, Bloor CM. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol*. 1987 Nov;253(5 Pt 2):H1279-88.
87. White FC, Carroll SM, Magnet A, Bloor CM. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion. *Circ Res*. 1992 Dec;71(6):1490–500.
88. Casani L, Sanchez-Gomez S, Vilahur G, Badimon L. Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering. *Thromb Haemost*. 2005 Oct 17;94(5):1035–41.
89. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the Vulnerable Plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr;47(8):C13–8.
90. Arbab-Zadeh A, Nakano M, Virmani R, Fuster V. Acute Coronary Events. *Circulation*. 2012;125(9).
91. Arbab-Zadeh A, Fuster V. The myth of the “vulnerable plaque”: Transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 3;65(8):846–55.
92. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, et al. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Jan 20;364(3):226–35.
93. Kubo T, Maehara A, Mintz GS, Doi H, Tsujita K, Choi S-Y, et al. The dynamic nature of coronary artery lesion morphology assessed by serial

- virtual histology intravascular ultrasound tissue characterization. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 13;55(15):1590–7.
94. Motreff P, Rioufol G, Finet G. Seventy-Four–Month Follow-Up of Coronary Vulnerable Plaques by Serial Gray-Scale Intravascular Ultrasound. *Circulation*. 2012;126(24).
  95. Bittencourt MS, Hulten E, Ghoshhajra B, O’Leary D, Christman MP, Montana P, et al. Prognostic Value of Nonobstructive and Obstructive Coronary Artery Disease Detected by Coronary Computed Tomography Angiography to Identify Cardiovascular Events. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7(2):282 LP – 291.
  96. Khanji MY, Bicalho VVS, van Waardhuizen CN, Ferket BS, Petersen SE, Hunink MGM. Cardiovascular Risk Assessment. *Ann Intern Med*. 2016 Nov 15;165(10):713.
  97. Arbab-Zadeh A, Fuster V. The Risk Continuum of Atherosclerosis and its Implications for Defining CHD by Coronary Angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Dec 6;68(22):2467–78.
  98. Worthley SG, Helft G, Fuster V, Zaman AG, Fayad ZA, Fallon JT, et al. Serial In Vivo MRI Documents Arterial Remodeling in Experimental Atherosclerosis. *Circulation*. 2000;101(6).
  99. Cuniculus O, Asml A, Ms I, Asmg K, MI R, Mm H, et al. Major Variation in Branches of the Abdominal Aorta in New Zealand White Rabbit. 2012;2:91–8.
  100. Tsukada T, Rosenfeld M, Ross R, Gown AM. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1986;6(6).
  101. Roberts DCK, West CE, Redgrave TG, Smith JB. Plasma cholesterol concentration in normal and cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 1974 May;19(3):369–80.
  102. Wannarong T, Parraga G, Buchanan D, Fenster A, House AA, Hackam DG, et al. Progression of Carotid Plaque Volume Predicts Cardiovascular Events. *Stroke*. 2013 Jul 1;44(7):1859–65.
  103. Helft G, Worthley SG, Fuster V, Fayad ZA, Zaman AG, Corti R, et al. Progression and Regression of Atherosclerotic Lesions. *Circulation*.

- 2002 Feb 26;105(8):993–8.
104. Chen H, Ricks J, Rosenfeld M, Kerwin WS. Progression of experimental lesions of atherosclerosis: Assessment by kinetic modeling of black-blood dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med*. 2013 Jun 1;69(6):1712–20.
  105. Zhang Z, Machac J, Helft G, Worthley SG, Tang C, Zaman AG, et al. Non-invasive imaging of atherosclerotic plaque macrophage in a rabbit model with F-18 FDG PET: a histopathological correlation. *BMC Nucl Med*. 2006 May 25;6(1):3.
  106. Lobatto ME, Fayad ZA, Silvera S, Vucic E, Calcagno C, Mani V, et al. Multimodal clinical imaging to longitudinally assess a nanomedical anti-inflammatory treatment in experimental atherosclerosis. *Mol Pharm*. 2010 Dec 6;7(6):2020–9.
  107. Tawakol A, Migrino RQ, Hoffmann U, Abbara S, Houser S, Gewirtz H, et al. Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Nucl Cardiol*. 2005;12(3):294–301.
  108. Vucic E, Dickson SD, Calcagno C, Rudd JHF, Moshier E, Hayashi K, et al. Pioglitazone modulates vascular inflammation in atherosclerotic rabbits monitored non-invasively with 18 F-fluorodeoxyglucose-PET/CT and black blood dynamic contrast enhanced-MRI. 2011;
  109. Ogawa M, Ishino S, Mukai T, Asano D, Teramoto N, Watabe H, et al. (18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. *J Nucl Med*. 2004 Jul 1;45(7):1245–50.
  110. Huet P, Burg S, Le Guludec D, Hyafil F, Buvat I. Variability and Uncertainty of 18 F-FDG PET Imaging Protocols for Assessing Inflammation in Atherosclerosis: Suggestions for Improvement. *J Nucl Med*. 2015;56:552–9.
  111. Joseph P, Ishai A, Mani V, Kallend D, Rudd JHF, Fayad ZA, et al. Short-term changes in arterial inflammation predict long-term changes in atherosclerosis progression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017 Jan 13;44(1):141–50.
  112. Hetterich H, Rominger A, Walter L, Habs M, Volpers S, Hacker M, et al.

- Natural history of atherosclerotic disease progression as assessed by 18F-FDG PET/CT. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2016;32(1):49–59.
113. Davies JR, Rudd JHF, Fryer TD, Graves MJ, Clark JC, Kirkpatrick PJ, et al. Identification of Culprit Lesions After Transient Ischemic Attack by Combined <sup>18</sup>F Fluorodeoxyglucose Positron-Emission Tomography and High-Resolution Magnetic Resonance Imaging. *Stroke*. 2005 Dec;36(12):2642–7.
114. Okane K, Ibaraki M, Toyoshima H, Sugawara S, Takahashi K, Miura S, et al. 18F-FDG accumulation in atherosclerosis: use of CT and MR co-registration of thoracic and carotid arteries. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 May 3;33(5):589–94.
115. Siegel RJ, Swan K, Edwalds G, Fishbein MC. Limitations of postmortem assessment of human coronary artery size and luminal narrowing: differential effects of tissue fixation and processing on vessels with different degrees of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1985 Feb;5(2 Pt 1):342–6.