

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Ecografía vascular tridimensional, un nuevo método
para la detección y la cuantificación de aterosclerosis
subclínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Beatriz López Melgar

DIRECTORES

**Borja Ibáñez Cabeza
Valentín Fuster Carulla
Carlos Macaya Miguel**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ECOGRAFÍA VASCULAR TRIDIMENSIONAL,
UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y LA
CUANTIFICACIÓN DE LA ATROSCLEROSIS
SUBCLÍNICA**

Beatriz López Melgar

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ECOGRAFÍA VASCULAR TRIDIMENSIONAL,
UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y LA
CUANTIFICACIÓN DE LA ATROSCLEROSIS
SUBCLÍNICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Beatriz López Melgar

Bajo la dirección de los Doctores

Borja Ibáñez Cabeza

Valentín Fuster Carulla

Carlos Macaya Miguel

Madrid, 2015

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Borja Ibáñez, por su esfuerzo y dedicación en este proyecto, por su comprensión y todo lo que de él he aprendido, por alentar y apoyar mi trabajo.

Al Dr. Valentín Fuster, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su equipo, por todas sus enseñanzas, por su ejemplo y su continua motivación para seguir avanzando.

Al Dr. Carlos Macaya, por haber confiado en mí, y por su apoyo e interés en este proyecto.

Y mi agradecimiento a todas las personas que me han alentado para llevar a cabo este trabajo: a los Dres. Jesús Jiménez-Borreguero y Leticia Fernández-Friera, por su predisposición y ayuda en todo lo que he necesitado, por vuestros consejos y por haber animado mis pasos; a Javier Sánchez por su tiempo, su empeño y por la dedicación que ha tenido con este proyecto; a Belén Oliva y a José Luis Peñalvo por sus consejos sobre la metodología y su ayuda con la estadística; a Jesús Mateo, por enseñarme todo sobre los modelos animales y por la meticulosidad con que ha dirigido al equipo para que todos nuestros proyectos salieran adelante; a Jean Paul Vilchez y a Alberto Cecconi, por estar conmigo tardes, noches y fines de semana empeñados en sacar los experimentos con los animales adelante; a Marta García por su inestimable ayuda en la presentación del trabajo final; a Charo, Alberto, Aurora y Virginia, sois grandes ecografistas y excelentes compañeros, gracias por colaborar en todo lo que os he necesitado; y en definitiva, a todos los que habéis hecho posible que hoy esté aquí.

A mis padres, Manolo y Encarna, y mis familiares, por estar siempre a mi lado y por vuestro cariño infinito. A Juanan, por soportar mis largas jornadas, mis vacaciones de trabajo, y mis encierros, por su incondicional apoyo. A Mauro.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ILUSTRACIONES	VI
LISTA DE TABLAS	X
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT	XXI
MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL	
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. IMPORTANCIA DE LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR.....	3
1.1.1. La valoración inicial del riesgo cardiovascular: las escalas de riesgo convencionales	3
1.1.2. La valoración avanzada del riesgo cardiovascular: el estudio de la aterosclerosis subclínica con técnicas de imagen no invasiva.....	3
1.1.3. Nuevas perspectivas en la valoración del riesgo cardiovascular con técnicas de imagen: la carga de aterosclerosis subclínica en el individuo.....	8
1.2. LA ECOGRAFÍA VASCULAR TRIDIMENSIONAL Y EL ESTUDIO DE LA CARGA DE ATEROSCLEROSIS.....	12
1.2.1. Evolución de la tecnología de ecografía vascular tridimensional	13
1.2.2. El método de ecografía vascular 3D real.....	18
1.2.3. Evidencia sobre la validez, viabilidad y reproducibilidad de la ecografía vascular 3D real	19
1.2.4. Situación actual de la ecografía vascular 3D real y justificación del proyecto ..	23
2. HIPÓTESIS	25

3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	31
4.1.1. Estudio de validación <i>in vitro</i> en un modelo de fantasmas ecográficos	31
4.1.2. Estudio de validación <i>in vivo</i> en un modelo animal de aterosclerosis precoz....	36
4.1.3. Estudio de validación clínica en un grupo de participantes de mediana edad libres de enfermedad cardiovascular	44
4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
4.2.1. Estudio de validación <i>in vitro</i>	51
4.2.2. Estudio de validación <i>in vivo</i>	52
4.2.3. Estudio de validación clínica.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN <i>IN VITRO</i>	56
5.1.1. Resultados generales de la precisión de la medida del volumen con el método de ecografía vascular 3D real.....	56
5.1.2. Influencia del tamaño de la placa en la precisión de la medida del volumen	56
5.1.3. Influencia de la profundidad del vaso en la precisión de la medida del volumen	58
5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN <i>IN VIVO</i>.....	60
5.2.1. Datos generales del estudio de validación <i>in vivo</i>	60
5.2.2. Precisión de la medida del volumen 3D real frente al <i>gold standard</i> de la medida del volumen por histología.....	62
5.2.3. Precisión de la medida de la suma de las áreas de placa o pseudo-volumen frente al <i>gold standard</i> de la medida de la suma de las áreas por histología	63

5.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN CLÍNICA EN UN GRUPO DE PARTICIPANTES DE MEDIANA EDAD LIBRES DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	65
5.3.1. Datos generales del estudio de validación clínica	65
5.3.2. Viabilidad del protocolo de estudio de la aterosclerosis precoz con ecografía vascular 3D real y su comparación con el método tradicional del barrido manual 2D.....	65
5.3.3. Fiabilidad en la detección de la aterosclerosis precoz de la ecografía vascular 3D real y su comparación con el método tradicional 2D.....	68
5.3.4. Consistencia en la detección de la aterosclerosis precoz de la ecografía vascular 3D real y su comparación con el método tradicional 2D.....	68
5.3.5. Reproducibilidad de la medida del volumen de aterosclerosis medido por el nuevo método de ecografía 3D real	69
6. DISCUSIÓN.....	74
6.1. PRECISIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DEL VOLUMEN EN EL EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	76
6.2. PRECISIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DEL VOLUMEN DE ATEROSCLEROSIS <i>IN VIVO</i>	83
6.3. VIABILIDAD, CONCORDANCIA Y REPRODUCIBILIDAD DE LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA CON ECOGRAFÍA VASCULAR 3D REAL.....	86
6.3.1. Viabilidad del protocolo	87
6.3.2. Fiabilidad y concordancia en la detección de placas carotideas y femorales.....	89
6.3.3. Reproducibilidad de la medida del volumen de placa en carótidas y femorales	90
6.4. LIMITACIONES.....	92

6.4.1. Limitaciones del trabajo	92
6.4.2. Limitaciones de la técnica de ecografía 3D.....	97
6.5. APORTACIÓN DE LA ECOGRAFÍA 3D FRENTE A LAS TÉCNICAS BASADAS EN LA ECOGRAFÍA 2D	98
6.6. UTILIDAD ACTUAL DE LA ECOGRAFÍA 3D.....	99
6.7. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES FUTURAS	100
7. CONCLUSIONES.....	102
8. BIBLIOGRAFÍA.....	105

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 Medidas del espesor máximo y del área de placa máxima en 2D de una placa en la arteria carótida izquierda.....	13
Figura 2 Resultados del estudio “HRP BioImage study”	15
Figura 3. Esquema de la evolución de las técnicas de ecografía vascular 3D.....	17
Figura 4 Esquema de la adquisición con la sonda lineal-volumétrica 3D.....	18
Figura 5 Fantoma de una placa de pequeño tamaño	31
Figura 6 Esquema del experimento de profundidad con fantasmas.....	33
Figura 7 Imagen de ecografía vascular 3D de un fantoma de placa de pequeño volumen	34
Figura 8 Análisis de las imágenes de ecografía vascular 3D de un fantoma.....	36
Figura 9 Esquema del procesamiento de las muestras de histología para el experimento de validación <i>in vivo</i>	39
Figura 10 Esquema del diseño del estudio de validación <i>in vivo</i>.....	40
Figura 11 Preparación para la realización de la ecografía vascular en un conejo New Zealand White	41
Figura 12 Adquisición y análisis 3D de la aorta abdominal del conejo.....	42
Figura 13 Análisis por planimetría de las secciones histológicas de placa.....	43
Figura 14 Diseño general del estudio PESA.....	46
Figura 15 Adquisición 2D y 3D de una placa en la arteria carótida izquierda	50
Figura 16 Adquisición y análisis 3D de una placa en la arteria femoral izquierda	51
Figura 17 Correlación entre el volumen medido en ecografía 3D y el volumen real en fantasmas de placas pequeñas	56
Figura 18 Correlación entre el volumen medido en ecografía 3D y el volumen real en fantasmas de placas moderadas-grandes.....	57

Figura 19 Representación gráfica de la precisión de la medida del volumen con ecografía 3D por el método de Bland-Altman	58
Figura 20 Correlación y representación gráfica de la medida del volumen con ecografía 3D en relación con la profundidad del vaso	59
Figura 21 Efectos sobre el perfil sérico lipídico inducido con la dieta rica en colesterol 0.2%	60
Figura 22 Histología e imagen ecográfica 3D de una placa localizada a nivel del origen de la arteria renal izquierda en el modelo de conejo	61
Figura 23 Calcificación en la aorta inducida con el modelo de denudación y dieta rica en colesterol.....	62
Figura 24 Correlación y gráfica de Bland-Altman de la medida del volumen de placa con ecografía 3D real frente al <i>gold standard</i> de la medida del volumen en histología.....	63
Figura 25 Correlación y gráfica de Bland-Altman de la medida de la suma de las áreas de la placa con el barrido manual 2D/pseudo-3D frente al <i>gold standard</i> de la suma de las áreas medida en histología.....	64
Figura 26 Gráficas de Bland-Altman de la medida del volumen por ecografía vascular 3D real en el subgrupo del estudio PESA.....	72
Figura 27 Gráficas de Bland-Altman de la medida del volumen por ecografía vascular 3D real en carótidas y femorales por separado	73
Figura 28 Esquema de los métodos de ecografía vascular 3D.....	78
Figura 29 Prevalencia de enfermedad aterosclerótica subclínica sistémica en la población del estudio PESA	79
Figura 30 Esquema de los 3 ejes del espacio de la imagen volumétrica	80
Figura 31 Esquema del barrido “en abanico” y su efecto sobre la resolución de la imagen de una placa pequeña con la profundidad	82

Figura 32 Reproducibilidad de la medida del volumen por 3D real en su representación gráfica de Bland-Altman. 92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Evidencia sobre la reproducibilidad de la medida del volumen de placa por el método de ecografía vascular 3D real	21
Tabla 2 Características demográficas y epidemiológicas de los participantes del estudio PESA.....	65
Tabla 3 Viabilidad del protocolo para el estudio de la aterosclerosis precoz con el nuevo método de ecografía vascular 3D real y del método tradicional del barrido manual por ecografía 2D	67
Tabla 4 Consistencia de la detección de aterosclerosis por ecografía vascular 3D real en el subgrupo de participantes del estudio PESA.....	69
Tabla 5 Reproducibilidad de la medida del volumen de aterosclerosis por ecografía vascular 3D real en el subgrupo de participantes del estudio PESA.....	70
Tabla 6 Resolución teórica de la sonda VL13-5	81

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2D: bidimensional

3D: tridimensional

2D/pseudo-3D: pseudo-3D basado en técnicas 2D

ACC: *American College of Cardiology* (Colegio Americano de Cardiología)

AHA: *American Heart Association* (Sociedad Americana de Cardiología)

cIMT: *carotid intima-media thickness* o grosor íntima-media carotideo

cm y cm/s: centímetros y centímetros por segundo

CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III

CV: cardiovascular

DEF: distancia entre *frames* o fotogramas

ECG: electrocardiograma

ECO: ecografía

ESC: *European Society of Cardiology* (Sociedad Europea de Cardiología)

dL: decilitro

18F-FDG: 18-fluorodesoxiglucosa o 2-fluoro¹⁸-2-desoxi-D-glucosa

g: gramo

GSM: *Grey Scale Median* o mediana de la ecodensidad por escala de grises

IM: intramuscular

LoA: *limit of agreement* o límite de concordancia

MACE: *major cardiovascular events* o eventos cardiovasculares mayores

mg: miligramo

mm: milímetro

mm²: milímetro cuadrado

mm³: milímetro cúbico

mmHg: milímetros de mercurio

µm: micra o micrómetro

PET: tomografía por emisión de positrones

PET/RM: imagen híbrida de tomografía por emisión de positrones y resonancia magnética

®: marca registrada

RM: resonancia magnética

ROI: *region of interest* o región de interés

SCORE: puntuación

SD o DS: *standard deviation* o desviación estándar

TAC: tomografía axial computarizada

US: ultrasonido

vs: *versus*

RESUMEN

ECOGRAFÍA VASCULAR TRIDIMENSIONAL, UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y LA CUANTIFICACIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA.

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es la causa más frecuente de morbimortalidad en la población, y por tanto, la búsqueda de nuevos marcadores de riesgo cardiovascular que hagan más efectivas las estrategias de prevención primaria es una prioridad. Actualmente, son los biomarcadores basados en el estudio directo de la aterosclerosis por técnicas de imagen no invasiva, los que han demostrado mejorar la capacidad de predecir eventos cardiovasculares frente a los métodos tradicionales como las escalas de riesgo basadas en la valoración de los factores de riesgo clásicos.

La ecografía vascular tridimensional (3D) surge como una nueva tecnología para el estudio de la aterosclerosis. Ésta permite cuantificar el volumen de placa como estimador de la carga de aterosclerosis que presenta un individuo. La cuantificación del volumen de placa por ecografía vascular 3D ha demostrado ser una medida más reproducible que la estimación por el método hasta ahora utilizado del barrido manual 2D/pseudo-3D por ecografía vascular 2D, que obtiene como medida de carga de aterosclerosis la suma de las áreas consecutivas de placa a modo de pseudo-volumen. Sin embargo, la precisión del nuevo método de ecografía 3D no se ha establecido, especialmente en la detección y cuantificación del volumen de placas pequeñas, típicas de la enfermedad subclínica en sus estadios más precoces. Ha sido en este tipo de placas en concreto, donde los antiguos métodos no se han mostrado precisos ni, por tanto, fiables. Además, debido a la novedad del uso de esta técnica para cuantificar carga aterosclerótica, no existen protocolos estandarizados de detección y cuantificación del volumen de placas en diferentes territorios arteriales, desconociéndose por tanto la viabilidad y la reproducibilidad de ésta nueva tecnología si se implementara en la práctica clínica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nosotros hipotetizamos que el método de ecografía vascular 3D real que utiliza la nueva sonda lineal-volumétrica es un método preciso en la detección y la cuantificación del volumen de placa aterosclerótica, tanto en placas grandes como, de manera más relevante, en placas pequeñas, comparado con los métodos previos basados en ecografía 2D. Para testar estas hipótesis, hemos diseñado un estudio de validación de la precisión de este nuevo método tanto *in vitro*, utilizando un modelo de fantomas ecográficos, como *in vivo*, utilizando el *gold standard* de la histología en un modelo animal de aterosclerosis. Finalmente, nos proponemos validar un protocolo clínico estandarizado para la detección y cuantificación de la aterosclerosis subclínica precoz, describiendo su viabilidad, fiabilidad y reproducibilidad frente a la práctica convencional con ecografía vascular 2D en la evaluación de las arterias carótidas y las femorales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio *in vitro* consistió en el diseño de nueve fantomas ecográficos de diferentes volúmenes (pequeños e intermedios-grandes) sumergidos a diferentes profundidades desde la superficie donde se escaneaban (superficiales vs >5cm de profundidad). El volumen medido con la nueva sonda lineal-volumétrica vascular 3D se comparó con el volumen real de los fantomas para establecer la precisión del método en los diferentes supuestos según el tamaño de la placa o su localización en profundidad.

El estudio *in vivo* se llevó a cabo en un modelo animal de aterosclerosis precoz inducido por dieta grasa y denudación endotelial en conejos de la raza New Zealand White, en los cuales, el volumen de placa en aorta abdominal medido por el nuevo método de ecografía 3D y el pseudo-volumen medido con el método tradicional del barrido manual 2D/pseudo-3D fue comparado con el *gold standard* de las medidas en histología.

Para el estudio de validación clínica, se describe un protocolo estandarizado para la detección y cuantificación de la aterosclerosis precoz, usando el bulbo carotideo y la bifurcación femoral como el centro de las adquisiciones, siendo así las referencias anatómicas que permitan una evaluación del mismo segmento arterial en estudios longitudinales. Esta validación de un protocolo estandarizado se ha llevado a cabo en una muestra aleatoria de 32 individuos incluidos dentro del estudio PESA-CNIC-Santander “The PESA: Progression of Early Subclinical Atherosclerosis Study”. En estos individuos han sido estudiadas las carótidas y las femorales, derecha e izquierda, con ecografías 2D y 3D, obteniendo un total 128 territorios explorados (64 de carótidas y 64 de femorales) para establecer la viabilidad, fiabilidad, y reproducibilidad inter e intra-observador, en la detección de la presencia de placas ateroscleróticas y la cuantificación del volumen de placa con 3D y compararlo con el método tradicional 2D.

RESULTADOS

El estudio *in vitro* mostró una excelente correlación entre las medidas de volumen medidas por ecografía 3D y el volumen real de los fantomas tanto para las placas de pequeño tamaño (entre 3.0 y 64.5 mm³) como para las placas de intermedio-gran tamaño (entre 91.1 y 965.5mm³) localizadas superficialmente a una profundidad de entre 2-3 cm, obteniendo unos índices de correlación intraclase (ICC) de 0.99 y 0.98 respectivamente. Sin embargo, cuando los fantomas se localizaron a una profundidad de 5cm, la correlación entre el volumen medido por 3D y el real fue sólo moderada (ICC = 0.67 vs ICC = 0.99 para los fantomas localizados en profundidad y los fantomas superficiales respectivamente).

En el estudio *in vivo* se demostró una correlación excelente entre el volumen de placa medido por ecografía vascular 3D y el volumen medido por histología (33.4 ± 27.99 vs 34.2 ± 29.04 mm³, ICC = 0.99 [4.02 - 92.5mm³]). Mientras que la correlación entre los valores de la

suma de las áreas de placa o pseudo-volumen con el barrido manual 2D/pseudo-3D y su medición por histología fue más pobre (203.2 ± 158.1 vs 124 ± 95.5 mm², ICC = 0.87 [49 - 520mm²]) mostrando una gran dispersión de las diferencias entre ambas determinaciones en la representación gráfica de Bland-Altman (error medio de 79.2mm²).

En el estudio clínico, todos los estudios de ecografía 3D y 2D de la muestra del PESA pudieron ser analizados sin observarse limitaciones por mala ventana o presencia de artefactos con éstas técnicas. Sesenta y nueve de los 128 (53%) territorios arteriales escaneados presentaron aterosclerosis en el estudio con 3D y 73 (57%) en el estudio con 2D, demostrando una buena concordancia entre ambas técnicas para la detección de la aterosclerosis subclínica precoz (*kappa* 0.89). La detección de placas con ecografía 3D fue muy reproducible entre observadores (*Kappa* entre 0.84 y 0.97) con resultados similares para las carótidas y femorales cuando se analizaban por separado, mientras que la reproducibilidad de la detección por 2D, aunque también fue buena, mostro ser ligeramente más variable (*kappa* entre 0.70 y 1). El volumen de placa aterosclerótica medido con ecografía vascular 3D en la muestra osciló entre 3.6 mm³ y 242.7 mm³. La reproducibilidad inter e intra-observador de la medición del volumen de aterosclerosis fue muy buena, con un ICC entre 0.81 y 0.97, observándose resultados igualmente buenos para la reproducibilidad del estudio del volumen de placa en carótidas (ICC entre 0.81 y 0.91) y femorales (ICC entre 0.83 y 0.93) por separado.

CONCLUSIONES

El método de ecografía vascular 3D real que utiliza la nueva sonda lineal volumétrica es preciso en la medición del volumen de placa, incluyendo aquellas de pequeño tamaño. Su precisión es mayor en la evaluación de territorios arteriales superficiales, como son las carótidas y las femorales, quedando cuestionada su fiabilidad en la evaluación de territorios profundos

(>5cm de profundidad). Además, es más precisa que el método tradicional del barrido manual 2D/pseudo-3D en la cuantificación de la carga de aterosclerosis.

Un protocolo clínico estandarizado para la valoración de la aterosclerosis subclínica precoz basado en la evaluación de los segmentos arteriales entorno al bulbo carotideo y la bifurcación femoral con el método de ecografía vascular 3D real es viable cuando se aplica a una población sana de individuos de mediana edad. Además, es fiable en la detección de la enfermedad incipiente comparado con la práctica convencional con ecografía 2D. La cuantificación del volumen o carga de aterosclerosis del individuo con el método de ecografía 3D real es una medida reproducible en los estadios precoces de la enfermedad de carótidas y femorales.

ABSTRACT

THREE-DIMENSIONAL VASCULAR ULTRASOUND, A NOVEL METHOD FOR DETECTING AND QUANTIFYING EARLY SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the leading cause of death and disability in the world and the introduction of effective strategies for primary prevention is a healthcare priority. Non-invasive imaged-based biomarkers in atherosclerosis have increasing evidence on their ability to predict cardiovascular risk complementing, and in some cases, improving traditional risk scales based on identifiable risk factors.

Three-dimensional vascular ultrasound (3DVUS) emerges as a novel technology for the study of atherosclerosis. This technology allows atherosclerotic plaque volume quantification as an estimate of the atherosclerotic plaque burden in the individual. Direct quantification of atherosclerotic plaque volume by 3DVUS has shown to be more reproducible than 2D ultrasound-based three-dimensional techniques that generate pseudo-3D volumes from summed 2D consecutive plaque areas as a measurement of atherosclerotic burden (method called “2D/3D-like freehand sweep method”). However, the accuracy of 3DVUS has not been established yet, especially in the detection and quantification of small plaques, hallmark of early atherosclerosis, a special setting where previous 3D methods have failed. Moreover, clinical protocols for subclinical atherosclerosis evaluation in different arterial territories using 3DVUS have never been proposed, and therefore, viability and reproducibility of 3DVUS in detecting and quantifying early disease in the clinical practice is unknown.

HIPOTHESIS AND OBJETIVES

We hypothesize that real 3D vascular ultrasound method using novel volumetric-linear array probe is accurate for plaque detection and plaque volume quantification in subclinical

medium-large size atherosclerotic plaques, and more relevant, in small size plaques at different peripheral arterial territories, compared to previous 2D-based 3D methods. Also, it is feasible and reproducible for detecting and quantifying early stages of atherosclerosis disease in clinical practice. To test our hypothesis, we designed a study to validate the 3DVUS method both, *in vitro*, using a model of echographic phantoms, and *in vivo*, using the histological gold standard in an animal model of atherosclerosis. Also, we propose and validate a new standardized clinical protocol for detecting and quantifying early atherosclerotic disease using 3DVUS by describing its feasibility and reproducibility and comparing it to standard practice using 2DVUS for the evaluation of superficial arterial territories like carotid and femoral arteries.

MATERIAL AND METHODS

The *in vitro* study consisted of nine phantoms of different volumes (small and medium-large) embedded at variable distances from the surface (superficial *vs* >5cm depth). 3DVUS volume data using novel volumetric-linear array method were compared against real phantom volumes to establish the effect of plaque size and depth in volume measurement accuracy.

The *in vivo* study was undertaken in an experimental New Zealand White rabbit model of early atherosclerosis induced with balloon endothelial denudation followed by cholesterol-rich diet in the abdominal aorta, in which real 3DVUS volume measurement and 2D/3D-like pseudo-volume (the sum of consecutive plaque areas) measurement were correlated against gold standard histological measurements.

For the clinical validation study, we describe a standardized protocol for detecting and quantifying early subclinical atherosclerosis that focus the evaluation of early disease in the carotid bulb and the femoral bifurcation, landmarks for the follow-up of the same diseased arterial segment in longitudinal studies, using both, standard practice with 2D ultrasound and novel 3DVUS method. This protocol is already being used in “the PESA: Progression of Early

Subclinical Atherosclerosis Study". A random sample of 32 studies, including 2D and 3DVUS data of 64 carotid and 64 femoral arteries from the baseline PESA cohort (4,186 asymptomatic, 65% males, 40 to 55 years old participants) was selected. Plaque detection and plaque volume quantification were analyzed for feasibility, reliability and inter and intra-observer reproducibility using 3DVUS method and compared to conventional 2D method.

RESULTS

In the *in vitro* setting, there was a strong correlation between 3DVUS measures and real phantom volume both for small (3.0 to 64.5mm³ size) and medium-large (91.1 to 965.5mm³ size) phantoms embedded superficially at 2-3 cm depth, with intraclass correlation coefficients (ICC) of 0.99 and 0.98, respectively. Conversely, when phantoms were placed at >5cm, the correlation between 3DVUS and real phantom volume was only moderate (ICC=0.67 and ICC=0.99 for deep and superficial respectively).

In the *in vivo* setting there was strong correlation between 3DVUS-measured plaque volumes and the histological gold standard (33.4 ± 27.99 vs 34.2 ± 29.04 mm³, ICC = 0.99 [4.02 to 92.5 mm³]). Conversely, the correlation between 2D/3D-like values and the histological gold standard (sum of plaque areas) was weaker (203.2 ± 158.1 vs 124 ± 95.5 mm², ICC = 0.87 [49 to 520 mm²]) with large dispersion of the differences between measurements in Bland-Altman plots (mean error 79.2 mm²).

In the clinical setting, all 3D and 2D vascular studies from PESA sample could be read without detecting limitations due to poor echographic window or severe artifacts. Sixty-nine out of 128 (53%) scanned arteries in PESA participants present atherosclerotic plaques on 3DVUS and 73 (57%) on 2DVUS showing good overall agreement in plaque detection between techniques (*Kappa* 0.89). Plaque detection using novel 3DVUS method was consistent between observers (*kappa* 0.84 to 0.97). Atherosclerotic burden using 3DVUS ranged from 3.6 mm³ to

242.7 mm³. Inter- and intra-observer agreement for volume measurement was good (ICC 0.81 to 0.97), with similar good results for carotid (ICC 0.81 to 0.91) and femoral (ICC 0.83 to 0.93) territories when analyzed separately.

CONCLUSIONS

Real 3DVUS method using the volumetric-linear array probe accurately measures plaque volumes, including those of small plaques. Measurements are highly accurate for superficial peripheral arterial territories, like carotids and femoral arteries; however, its accuracy is questioned when localized in deep territories (>5cm depth). Moreover, 3DVUS method is more accurate than previous 2D/3D-like freehand method in quantifying atherosclerotic burden.

A standardized clinical protocol for screening early subclinical atherosclerosis based on the evaluation of the carotid bulb and the femoral bifurcation using real 3DVUS is feasible as demonstrated here in a disease-free middle-aged population. Also, it is reliable in the detection of early stages of the disease compared to 2D standard practice. Furthermore, novel 3DVUS is a reproducible tool for the quantification of early subclinical atherosclerotic burden in the carotid and femoral arteries in the individual.

MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR

La enfermedad cardiovascular (CV) aterotrombótica es la principal causa de morbimortalidad en la población y la aterosclerosis es su estadio preclínico (1, 2). Sin embargo, no todos los individuos con aterosclerosis van a desarrollar enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, ictus o muerte de causa cardiovascular) ni la enfermedad desencadena exclusivamente las lesiones obstructivas o severas, de ahí la importancia de estudiar marcadores capaces de predecir su comportamiento y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares (3).

1.1.1. La valoración inicial del riesgo cardiovascular: las escalas de riesgo convencionales

Los factores de riesgo clásicos y las escalas de riesgo tradicionales han demostrado su utilidad en la predicción del riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares (4), aunque con limitaciones en algunos subgrupos de población (5). Este hecho se confirma cuando observamos que la mayor parte de los eventos coronarios ocurren entre pacientes *a priori* no considerados de “alto riesgo” por estas escalas (6), resaltando la necesidad de estudiar nuevas vías de estimación del riesgo CV (7).

1.1.2. La valoración avanzada del riesgo cardiovascular: el estudio de la aterosclerosis subclínica con técnicas de imagen no invasiva

La aterosclerosis subclínica se ha relacionado con un sustancial incremento del riesgo de padecer eventos cardiovasculares, tanto la detectada en las arterias coronarias como la detectada en arterias periféricas como en las carótidas, en la aorta o incluso en las arterias femorales (8-13). Incluso la detección de enfermedad severa en un territorio ha demostrado asociarse con la presencia de afectación aterosclerótica en otros territorios (14) apoyando la idea de que su afectación es principalmente sistémica. Por ello, la detección, cuantificación y

caracterización de la aterosclerosis subclínica sistémica se propone como un objetivo más en la evaluación cardiovascular capaz de facilitar el diagnóstico de la enfermedad incluso en estadios precoces, valorar el perfil de riesgo cardiovascular del individuo e incluso para llegar a establecer actuaciones de prevención tempranas (15, 16).

Las nuevas tecnologías de imagen no invasiva están abriendo nuevas expectativas en la detección, cuantificación y caracterización de la aterosclerosis a nivel de los distintos territorios vasculares arteriales, de hecho, los estudios más recientes de riesgo cardiovascular se están centrando en la búsqueda de nuevos biomarcadores de la propia aterosclerosis subclínica valiéndose de las técnicas de imagen multimodalidad principalmente con ecografía o ultrasonidos (US), tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética (RM) o tomografía por emisión de positrones (PET).

1.1.2.1. Ecografía bidimensional: el grosor íntima media y la detección de enfermedad aterosclerótica

Los ultrasonidos se mantienen como la primera opción para el estudio extensivo de la aterosclerosis subclínica en la población general. Tienen una amplia disponibilidad y un bajo coste, no usan radiación y además pueden detectar, cuantificar y caracterizar las placas según su tamaño, morfología y e incluso su composición (17, 18).

Los ultrasonidos permiten estudiar con detalle la pared del vaso pudiendo detectar la presencia de aterosclerosis desde sus estadios más precoces (grosor íntima-media aumentado o placas incipientes) hasta la presencia de enfermedad avanzada (placas obstructivas o complicadas). El grosor íntima-media de carótidas (cIMT del inglés “carotid intima media thickness”) ha sido el biomarcador ecográfico más estudiado dentro de la valoración del riesgo CV con ecografía 2D. Sin embargo, se ha relegado a una recomendación *Clase III Nivel de evidencia B* en las últimas guías de riesgo CV ACC/AHA 2013 (16) a la luz de 3 grandes

metaanálisis que han cuestionado su utilidad en la predicción de eventos cardiovasculares y por tanto su uso de manera rutinaria para la toma de decisiones en prevención primaria (19-21). La limitación del cIMT radica en que su engrosamiento no obedece exclusivamente al desarrollo de aterosclerosis, sino que puede ser reflejo de otras cosas, una hiperplasia intimal o una hipertrofia fibromuscular por factores genéticos, hipertensión arterial o simplemente por reflejo de la edad (22, 23). Por otra parte, la ecografía vascular 2D ha encontrado en la detección de la presencia de placas de aterosclerosis y su caracterización con medidas bidimensionales como su espesor, su área máxima o su densidad acústica, relación con el riesgo CV individual tanto para la predicción de eventos coronarios como cerebrovasculares, superando a la capacidad de predicción del cIMT (9, 11, 12, 24-27). De hecho, las últimas guías Europeas del 2012 reconocen la valoración de la placa por ultrasonidos como una técnica razonable para la estratificación del riesgo en adultos asintomáticos con riesgo CV intermedio por las escalas tradicionales (*recomendación Clase IIa, Nivel de evidencia B*) (15). Sin embargo, la propia técnica de ecografía 2D es altamente observador-dependiente. La placa es una estructura tridimensional, de manera que su valoración en una imagen de sólo 2 dimensiones exige elegir una zona, la más representativa de toda su extensión, donde centrar el estudio. Esto va a limitar la reproducibilidad de sus resultados a la experiencia del personal técnico y médico evaluador que elijan porciones de placa similares para su cuantificación y caracterización (28, 29). Más aún, hace difícil extrapolar los resultados de un laboratorio a otros centros de imagen si no tienen el mismo nivel de experiencia en la evaluación de la aterosclerosis (30).

1.1.2.2. Tomografía axial computarizada para la cuantificación del score de calcio coronario

La detección y cuantificación de la presencia de aterosclerosis subclínica mediante TAC coronario por el método del Score de Calcio, es la técnica de imagen actualmente recomendada en la valoración del riesgo cardiovascular por las guías americanas ACC/AHA del 2013 (10) y

del 2014 (31) y las guías europeas ESC del 2012 (15). Ésta es una técnica sencilla y reproducible, cuyo uso se ha estandarizado en la práctica clínica (32) y sus valores de referencia para la población general están ampliamente definidos (33). La relación de la carga de calcio coronario con el pronóstico CV está bien establecida, habiéndose demostrado en grandes estudios como el MESA (34-37) o el estudio de Rumberger et al (38) con cerca de 11.000 pacientes, y en metaanálisis como el de Budoff et al (39), que la presencia de calcio en las arterias coronarias es un predictor sólido de eventos cardiovasculares. Además, la cantidad de calcio es un marcador de enfermedad aterosclerótica teniendo una correlación directamente proporcional con la cantidad o carga de placa evaluada mediante histología, ecografía intravascular y angiografía (40-42). Pero sobre todo es muy valioso su buen valor predictivo negativo (40, 43). 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 (44). Sin embargo, existe evidencia controvertida sobre su uso en ciertos grupos de población, habiéndose mostrando limitado a la hora de predecir eventos cardiovasculares en individuos jóvenes y en mujeres (45-47). También es discutida su utilidad para monitorizar los cambios en el perfil de riesgo CV en pacientes que han iniciado tratamiento intensivo con hipolipemiantes (48), habiéndose demostrado que el tratamiento con estatinas incrementa la presencia de calcio coronario como efecto estabilizador de la aterosclerosis, aumentando la porción fibrocálcica y por tanto benigna de las placas al conseguir la reducción de su núcleo lipídico, y no por un avance de la enfermedad (49). Además, el estudio limitado al epifenómeno de la calcificación y no de la placa completa, se asocia a una muy baja sensibilidad para la detección de enfermedad significativa (obstrucción coronaria $\geq 50\%$) (15, 50). Por otra parte, su uso en la población general sana no es fácil extender al ser una técnica que administra radiación aunque sólo sea a dosis bajas.

1.1.2.3. Otras técnicas de imagen: la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones

La detección y cuantificación de la aterosclerosis por RM se está usando en estudios terapéuticos para valorar la progresión de las placas ateroscleróticas y su respuesta a diversos tratamientos en arterias como las carótidas o la aorta (51). La valoración tridimensional del vaso que permite la RM da la posibilidad de cuantificar el volumen de enfermedad aterosclerótica, una variable más representativa de la carga de enfermedad en un individuo (52-54) y lo hace de manera precisa y reproducible gracias a la elevada resolución de la técnica y sin usar radiación. Además, las propiedades físicas de la RM permiten diferenciar la composición de la placa, pudiendo estudiar la presencia de características de riesgo de las placas de aterosclerosis (55-58), lo que se ha venido describiendo como las características de vulnerabilidad de la placa: la extensión del núcleo lipídico y el espesor de su capa fibrosa, la presencia de úlceras en la superficie (59), de hemorragia dentro del núcleo o la presencia de neovasos inmaduros dentro de las placas (60, 61). Existe cierta evidencia a favor de que éstas características parecen tener una mayor relación con el desarrollo de eventos CV incluso por encima de la valoración del grado de obstrucción que producen las placas en la luz del vaso (62, 63) al igual que ocurre con evidencia que comienza a aparecer a favor de la cuantificación de la carga de aterosclerosis (64). Sin embargo, la técnica de RM arterial es compleja, su interpretación requiere una gran experiencia, su disponibilidad es limitada y su coste-efectividad para el estudio poblacional es más que dudosa.

Igual que para los vasos de intermedio y gran calibre, se ha tratado de extender las posibilidades de estudio de la aterosclerosis con RM a las placas de las arterias coronarias. Pero, aunque se ha producido un gran avance en los últimos años, existen ciertas limitaciones técnicas añadidas debido a su pequeño tamaño, su tortuosidad y el movimiento continuo cardíaco y

respiratorio, que todavía no han permitido conseguir dar el salto a la clínica para la búsqueda de marcadores de riesgo.

Otras técnicas como el PET/TAC con 18-fluorodesoxiglucosa (18F-FDG) se correlacionan con la presencia de macrófagos e inflamación de la placa de aterosclerosis (65, 66). Estudios en pacientes que han desarrollado un evento cerebrovascular aterotrombótico han comprobado que la actividad inflamatoria carotídea está relacionada con el riesgo de ocasionar un nuevo evento CV (67, 68). Además, la inflamación parece no comportarse sólo localmente. En pacientes con enfermedad coronaria establecida, se ha demostrado una alta prevalencia de placas carotídeas inflamadas, con un nivel de actividad inflamatoria que a su vez se correlacionaba con la mayor presencia de factores de riesgo CV y biomarcadores séricos proinflamatorios, sugiriendo la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica en los pacientes con enfermedad cardiovascular que podría colaborar en la inestabilización y progresión de otras lesiones distales a la causante del evento inicial (69). Sin embargo, el uso del PET 18F-FDG en la valoración del riesgo CV como estrategia de prevención primaria se limita a estudios de investigación, al igual que ocurre con la RM, por su complejidad, su menor disponibilidad y, en este caso además, por ser una técnica que administra una dosis de radiación nada despreciable y lo hace a nivel sistémico.

1.1.3. Nuevas perspectivas en la valoración del riesgo cardiovascular con técnicas de imagen: la carga de aterosclerosis subclínica en el individuo

1.1.3.1. Del estudio de la placa vulnerable al estudio de la cantidad o carga de aterosclerosis

Este gran desarrollo de las tecnologías de imagen para la valoración del riesgo CV en los últimos años ha obedecido a la ya comentada necesidad de mejorar el valor predictivo de las herramientas convencionales basadas en los factores de riesgo CV clásicos, para ello se han

seguido dos estrategias bien diferenciadas: la primera y más ampliamente estudiada ha sido la de buscar identificar la presencia de placas de aterosclerosis con alto riesgo de ruptura o placas vulnerables (70), y la segunda, más reciente y actualmente en un momento de mayor desarrollo, es la estrategia que busca evaluar la cantidad o carga global de enfermedad aterosclerótica en el individuo.

El concepto de la placa vulnerable tiene su origen en los primeros estudios anatomopatológicos de pacientes que habían sufrido un infarto en los que las características de una placa rota con una cápsula fibrosa adelgazada o un core lipídico extenso coincidían como las lesiones responsables del infarto, postulando que la presencia de este tipo de placas aseguraba un mayor riesgo de padecer un evento coronario agudo (71-73). De aquí que la caracterización de las placas por sus particularidades morfológicas, su composición o su grado de inflamación, haya sido el objetivo principal de grandes estudios clínicos, encontrando resultados contradictorios. Estudios clínicos que utilizaban imagen coronaria invasiva, como el estudio PROSPECT (74, 75) o el estudio VIVA (76) ambos usando ecografía intracoronaria (IVUS), han demostrado que dirigir la valoración del riesgo de infarto o muerte de causa CV a la presencia de lesiones vulnerables por sus características no mejora significativamente la capacidad predictiva de los marcadores tradicionales, y que una carga de aterosclerosis coronaria mayor del 70%, de entre todas las variables invasivas evaluadas, fue la que mejor se correlacionó con el desarrollo de eventos cardiovasculares mayores (MACE, del inglés “major adverse cardiovascular events”) en el seguimiento. Mientras, otros estudios que han usado imagen no invasiva, como el TAC en la valoración del remodelado y composición de las placas de aterosclerosis coronaria (77, 78) o la RM carotídea en el estudio de la presencia de hemorragias intra-placa (60, 79) sí han visto relación con un peor pronóstico CV. Lo que ninguno de estos estudios ha valorado de manera independiente es la cantidad o carga global de enfermedad aterosclerótica que parecería ser la causa común que subyace en los individuos

que presentan un mayor número de lesiones con características de vulnerabilidad (80), proponiéndose como el factor de confusión por el que se encuentran estos resultados tan controvertidos.

Los mecanismos que llevan a una placa a desarrollar un evento CV agudo tras su ruptura son muy complejos. Las placas sufren fenómenos de ruptura y cicatrización continuamente y no por eso desencadenan eventos cardiovasculares (81-85). La respuesta hacia la cicatrización o hacia la trombosis tras una ruptura se ve modulada no sólo por la morfología, la composición o la actividad metabólica de la placa, sino también por características individuales como la respuesta trombótica o la función endotelial del individuo que también son críticas a la hora de determinar el desarrollo de un evento CV (86). Por todo ello, los nuevos estudios están abandonando la idea de buscar una única placa vulnerable hacia la valoración de la carga global de enfermedad aterosclerótica que va a englobar, de manera más integradora, los aspectos de que a mayor carga de aterosclerosis más presencia de placas vulnerables y más fenómenos de ruptura en el individuo, y de que la presencia de una importante carga de aterosclerosis en un individuo es un reflejo del efecto real y acumulativo que están teniendo los factores de riesgo establecidos y los individuales o genéticos menos establecidos. De esta manera, la evaluación de la carga global de aterosclerosis sería un reflejo de la mayor susceptibilidad a la enfermedad CV del individuo.

1.1.3.2. Del estudio de un único territorio arterial al estudio de la afectación en múltiples territorios

Los estudios clásicos evaluaban la presencia de enfermedad aterosclerótica carotídea y su asociación al desarrollo de eventos cerebrovasculares, y la enfermedad coronaria al desarrollo de eventos coronarios. Sin embargo, grandes estudios poblacionales, como el “Rotterdam study” (87), el “Cardiovascular Health study” (14) o el estudio publicado por

Spence et al (88), observaron que marcadores carotideos, como el cIMT o la presencia de placas carotideas, se correlacionaban no sólo con el desarrollo de ictus sino también de eventos coronarios y muerte de causa CV, y lo mismo para la enfermedad en las arterias coronarias y el desarrollo de ictus como se observó en el estudio MESA (46, 89), en el estudio CARDIA (90) o en el estudio de Budoff et al (91). Por otra parte, aunque las placas más estudiadas han sido las carotideas y las coronarias, la aterosclerosis es una enfermedad diseminada sistémicamente, y la importancia de la evaluación de múltiples territorios ha quedado patente en importantes estudios como el CAFES-CAVE (12) en el que añadiendo la valoración de placas en el territorio femoral a la valoración carotidea se mejoraba la detección de desarrollar eventos cardiovasculares de cerca de 10.000 participantes a los 10 años, el estudio ARIC que valoró el territorio carotideo y poplíteo conjuntamente (92) o el “Rotterdam study” (93) que con la evaluación de la aterosclerosis en la aorta abdominal junto con la de las carótidas en unos 6.000 individuos logró predecir con mayor precisión que el cIMT el riesgo de sufrir un infarto de miocardio.

Nuestro grupo también ha confirmado la importancia de extender la valoración de la aterosclerosis a múltiples territorios en los datos recientemente publicados de la cohorte basal del estudio PESA-CNIC-Santander (“The PESA: Progression of Early Subclinical Atherosclerosis study”) (94). Este estudio, que ha reclutado a más de 4.000 individuos sanos de entre 40 y 55 años, ha demostrado una alta prevalencia de enfermedad aterosclerótica subclínica en un grupo de población *a priori* de bajo riesgo CV, y sobre todo, la mayor prevalencia de la enfermedad en el territorio femoral sobre otros territorios, como el carotideo o el coronario, en sus estadios más precoces (95). Por todo ello, cualquier estrategia de valoración del riesgo CV mediante el estudio de la aterosclerosis subclínica en población joven o de mediana edad asintomática, esto es, estrategias que se quieran aplicar en estadios precoces de la enfermedad

aterosclerótica, deberían incluir la valoración de múltiples territorios incluyendo el territorio femoral.

1.2. LA ECOGRAFÍA VASCULAR TRIDIMENSIONAL Y EL ESTUDIO DE LA CARGA DE ATEROSCLEROSIS

Los ultrasonidos, por su accesibilidad, su coste y la ausencia de radiación, ocupan una posición privilegiada dentro del armamento de técnicas de imagen para el estudio de la aterosclerosis subclínica en la población sana, y por tanto, sería la tecnología ideal para la evaluación y re-estratificación del riesgo CV en la población general. Y es que, la ecografía vascular permite estimar la carga de aterosclerosis, un marcador de riesgo CV más integrador, y además, es accesible a la exploración de múltiples territorios vasculares.

Con ecografía vascular 2D pura se ha tratado de buscar medidas relacionadas con la carga global de aterosclerosis, como el espesor máximo o el área máxima de la placa de aterosclerosis (Figura 1), en un intento de explorar la relación de estas variables con el riesgo CV (11, 88). Pero, valorar una estructura tridimensional, como son las placas de aterosclerosis, con una técnica de imagen 2D se postula como la principal limitación para alcanzar una verdadera cuantificación de la carga de aterosclerosis. Por el contrario, la ecografía vascular 3D ofrece la posibilidad de valorar la placa de forma completa, sin tener que elegir la zona más representativa para centrar el estudio de ésta. Además, el 3D cuantifica el volumen, una medida que integra los tres aspectos, el de la presencia, la severidad y la extensión de la enfermedad, y que en otras técnicas de imagen cardíaca, como la ecocardiografía, se ha establecido como la más precisa y reproducible frente a medidas 2D como el área o los diámetros (96). Por todo ello, la tecnología de ecografía vascular 3D se propone como una mejor técnica de imagen para la detección y la cuantificación de la carga de aterosclerosis subclínica extracoronaria en el individuo.

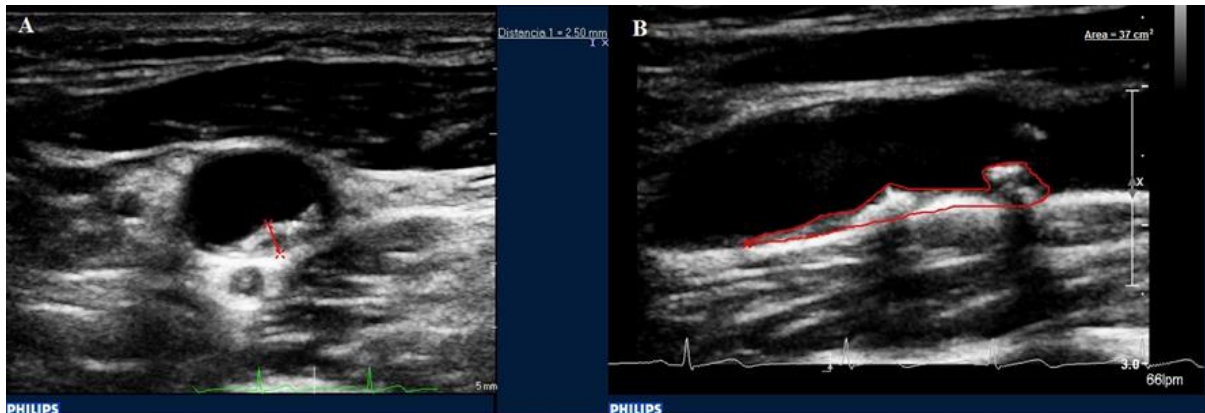


Figura 1 Medidas del espesor máximo y del área de placa máxima en 2D de una placa en la arteria carótida izquierda

1.2.1. Evolución de la tecnología de ecografía vascular tridimensional

1.2.1.1. *Ecografía vascular pseudo-3D basada en el barrido manual 2D*

Valorar el volumen de placa para cuantificar la carga de aterosclerosis requiere un método preciso y fiable, de ahí que múltiples técnicas de ecografía 3D se hayan venido desarrollando desde que Delker et al (97) en 1994 describiera el primero de los métodos de reconstrucción tridimensional. El método más ampliamente estudiado en la clínica ha sido el método del barrido manual 2D/pseudo-3D para las carótidas que consiste en realizar un barrido manual a lo largo del cuello con una sonda 2D lineal convencional y reconstruir estas imágenes consecutivas en un “pseudo-volumen”. Éste método calcula una grosera aproximación al volumen real de aterosclerosis mediante la cuantificación de la suma de las áreas de la placa consecutivas adquiridas en una visión generalmente axial del vaso durante el barrido. Fácilmente se puede comprender que la velocidad del barrido, al ser totalmente manual, no es constante, ni dentro de la propia adquisición, ni si ya hablamos de adquisiciones en diferentes momentos hechas por un mismo operador o entre operadores diferentes, lo que sería la reproducibilidad intra e inter-observador respectivamente, limitando la generalización de los

resultados exclusivamente a laboratorios altamente especializados y entrenados para este tipo de adquisiciones (30). Además, la distancia entre las imágenes o *frames* (o fotogramas en inglés) adquiridos no es conocida al no controlar la velocidad a la que se desplaza manualmente la sonda, ni tampoco igual ni constante, de manera que no es posible calcular la medida real del volumen en este tipo de adquisiciones, por eso se habla de “pseudo-volumen” o suma de las áreas de placa en mm².

Aun con las limitaciones descritas, este ha sido el método 3D utilizado en los primeros estudios clínicos donde se ha demostrado que las mediciones de la carga de aterosclerosis mediante la estimación del volumen de placa, predicen con mayor precisión el riesgo de padecer un evento CV (98, 99). “The High Risk Plaque (HRP) BioImage Study” es el estudio que más recientemente ha comprobado en 6.000 pacientes mayores de 55 años (100), que la evaluación de la carga de aterosclerosis por técnicas de imagen como el eco 3D vascular, concretamente mediante el método del barrido manual 2D/pseudo-3D y su medida de la suma de las áreas de placa detectadas en las carótidas, mejora la predicción del riesgo CV frente a las escalas tradicionales de una manera similar a como lo hace la cuantificación del calcio score coronario por el método de Agatston (Figura 2) (101). Éste hallazgo ha generado nuevas expectativas para la evaluación de la carga de aterosclerosis con ultrasonidos, causado una revolución en el campo de la valoración del riesgo CV mediante técnicas de imagen no invasiva como se demuestra en recientes artículos de opinión y revisión (102, 103).

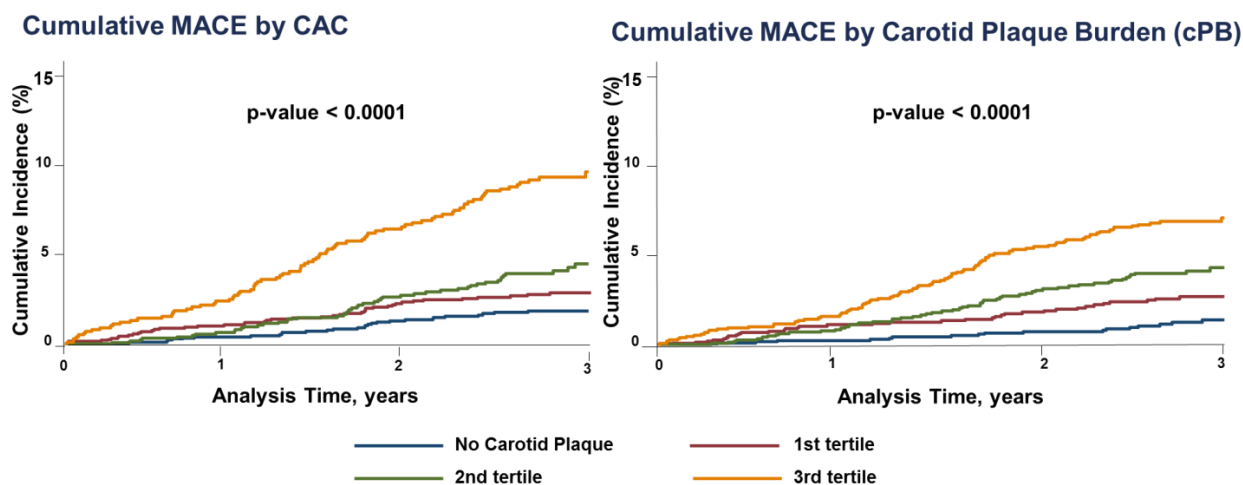


Figura 2 Resultados del estudio “HRP BioImage study”

El calcio score coronario por TAC predice los eventos cardiovasculares mayores de una manera similar a la carga de aterosclerosis carotidea medida con ecografía vascular pseudo-3D. Imagen obtenida de Barber et al (101).

MACE: *mayor cardiovascular events* o eventos cardiovasculares mayores (infarto de miocardio, ictus, muerte de causa cardiovascular). CAC: *coronary artery calcification* o score de calcio coronario medido con TAC. cPB: *carotid plaque burden* o carga de aterosclerosis carotidea medido con ecografía vascular 2D/pseudo-3D.

1.2.1.2. Ecografía vascular 3D con guía mecánica externa

Para solventar la limitación de no tener una velocidad de barrido constante y conocida que permita saber y controlar la distancia entre *frames*, se propusieron métodos de adquisición automáticos usando dispositivos robotizados externos que desplazan la sonda a una velocidad constante a lo largo del paciente (Figura 3). Este método también utiliza una sonda 2D lineal convencional acoplada a un brazo robótico permitiendo conseguir una resolución en el eje *z* lateral o distancia entre *frames* de entre 0.5 y 5 mm según los diferentes estudios (97, 104). Sin embargo, la adquisición con guía mecánica externa ha resultado ser laboriosa y no existe un dispositivo comercializado, de manera que su uso se ha limitado a unos pocos centros en los que desarrollaban sus propios dispositivos en colaboración con equipos de ingeniería para la realización de pequeños estudios orientados a la validación de la técnica sin haberse llegado a extender su uso en la clínica. Ha sido en estos estudios de validación, además, donde se han

descrito los problemas que ha mostrado tener este método con su resolución espacial debido a la distancia entre *frames* que consigue. Ésta distancia entre *frames*, de entre 0.5 y 5mm, se ha visto que limita la resolución de las imágenes volumétricas, comprometiendo la precisión y la reproducibilidad de la medida del volumen especialmente para volúmenes de placa pequeños, por debajo de los 69 mm³ (104-107). Es quizá por este hecho que la evidencia en la valoración de la carga de aterosclerosis mediante la cuantificación del volumen se ha restringido al estudio de la aterosclerosis localizada en las carótidas, en paciente con enfermedad en grado moderado o severo, esto es, en pacientes de alto riesgo CV o que ya han desarrollado un ictus o un accidente isquémico transitorio. La aterosclerosis subclínica en estadios precoces, es decir, placas pequeñas incipientes, localizadas en otros territorios sistémicos como en las femorales, donde se ha visto que parece comenzar la enfermedad (95), o su aplicación a la población general que incluya individuos de bajo riesgo CV, nunca se ha explorado en estudios clínicos probablemente a la vista de las limitaciones comunicadas en los estudios de validación.

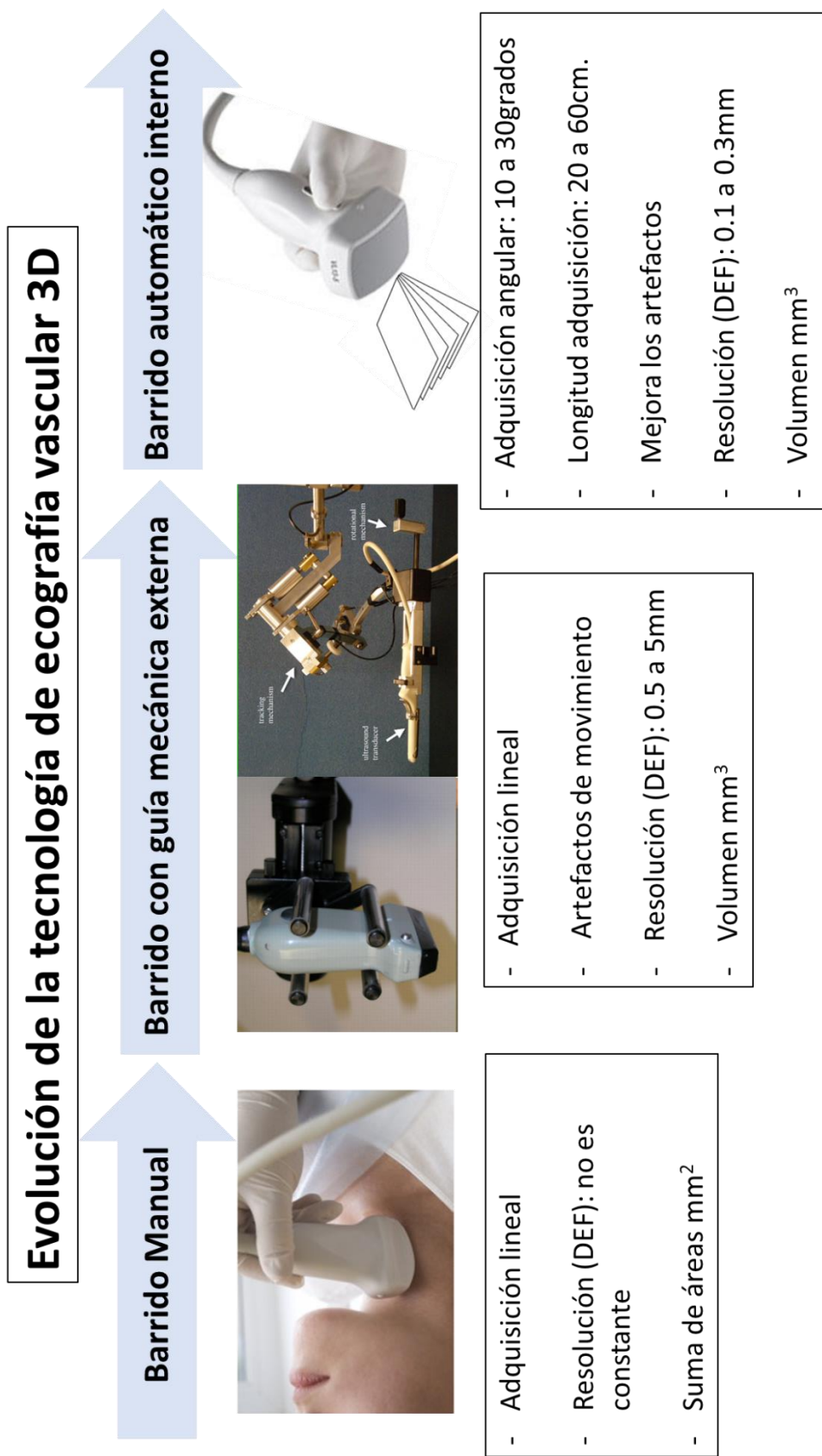


Figura 3. Esquema de la evolución de las técnicas de ecografía vascular 3D
 Imágenes de la guía mecánica externa tomadas de Fenster et al 2011 (108). Imágenes de la sonda 2D L11-3 y 3D VL13-5 aportadas por Philips Healthcare®
 DEF: distancia entre frames

1.2.2. El método de ecografía vascular 3D real

Es en la actualidad cuando la tecnología de ecografía vascular 3D parece avanzar en la evaluación de la aterosclerosis subclínica en estadios precoces gracias a la aparición de las sondas lineales volumétricas (Figura 3). Son sondas con una guía mecánica interna del haz de ultrasonidos capaces de hacer un barrido angular automático. Éstas adquieren imágenes volumétricas de un segmento arterial de hasta 6 cm de longitud en unos 2 segundos apoyando el transductor en una posición fija sin necesidad de desplazarlo, lo que simplifica y estandariza la adquisición (Figura 4). Su rango de frecuencia es de 5 a 13 MHz, lo que posibilitaría la exploración de estructuras superficiales así como las situadas a cierta profundidad, y permitiría ampliar sus posibles indicaciones al estudio de otros territorios arteriales además de las carótidas. Además, su resolución en el eje z o lateral es alta, consiguiendo una distancia entre *frames* de entre 0.3 mm hasta 0.1 mm, lo que mejora la definición de la estructura escaneada tanto para la cuantificación del volumen o de sus características morfológicas.



Figura 4 Esquema de la adquisición con la sonda lineal-volumétrica 3D

La sonda VL13-5 (Philips Healthcare, Andover, MA, USA) con una guía mecánica interna del haz de ultrasonidos, puede realizar un barrido angular automático de la estructura de hasta unos 6 cm de longitud cuando se selecciona un ángulo de 30 grados.

Así mismo, su software de análisis simplifica la visualización tridimensional del vaso segmentándolo en cortes axiales consecutivos sobre los que se trazan los límites de la capa intima-media y de la placa de ateroma ayudados por un sistema de detección semiautomático que lo segmenta a lo largo de todo el vaso. Éste análisis, a diferencia de los anteriores, calcula el volumen de las estructuras con un algoritmo verdaderamente tridimensional estableciendo mallas 3D sobre las superficies de la pared del vaso, la luz del vaso y la placa, y lo hace de una manera semiautomática, mejorando la estandarización del análisis. Éste software representa una importante diferencia respecto de los antiguos métodos de análisis 3D que usan el algoritmo de sumación de discos multiplicado por la distancia entre ellos o distancia entre *frames*, y por tanto, en los que su precisión depende directamente de la distancia entre *frames* que se consigue en la adquisición.

El primer estudio en establecer la utilidad clínica de este nuevo método para la valoración de la aterosclerosis carotídea ha sido el estudio de Johri et al (109). En sus conclusiones se establece que la cuantificación de una carga de placa carotídea inferior a 90 mm³ predice de la ausencia de enfermedad coronaria significativa con una sensibilidad del 98% en pacientes con baja probabilidad pre-test de presentar enfermedad coronaria significativa, abriendo una gran cantidad de posibilidades para la ecografía 3D real en la práctica clínica.

1.2.3. Evidencia sobre la validez, viabilidad y reproducibilidad de la ecografía vascular 3D real

Aunque el abanico de posibilidades de aplicación en la clínica de la ecografía vascular 3D es potencialmente grande, la evidencia básica sobre la validez de los métodos descritos es muy limitada, faltando también información sobre su viabilidad o reproducibilidad según los diferentes contextos clínicos donde tendría cabida su utilización.

La precisión de la medida del volumen por el método de ecografía vascular 3D real sólo ha sido comunicada *in vitro* en experimentos con fantasmas de placas de intermedio y gran tamaño, como en el estudio de Johri et al (109) que utilizó un único fantoma de 1.000 mm³ y el de Graebe et al (30) que utilizó fantasmas de mayor tamaño entre 100 y 1.500 mm³. Al margen de esta evidencia, **no existen estudios que hayan valorado la precisión ni *in vitro* ni *in vivo* de la medida del volumen 3D real ni tampoco de la medida de la carga de aterosclerosis por el método hasta ahora más utilizado en clínica del barrido manual 2D/pseudo-3D.**

En un intento de aproximarse a una valoración de la precisión de estas técnicas *in vivo*, 3 estudios recientes han comunicado la reproducibilidad de los métodos de ecografía 3D real y de 2D/pseudo-3D en pacientes con estadios avanzados de enfermedad aterosclerótica en el territorio carotideo. Los hallazgos de estos 3 estudios se resumen en la Tabla 1. Los resultados de los estudios de Graebe et al (30) y AlMuhanna et al (110) concluyeron que la reproducibilidad del volumen 3D es mejor que la reproducibilidad de la medida de las áreas por el método tradicional 2D/pseudo-3D para la cuantificación de placas de intermedio-gran tamaño carotideas. Nada se ha comunicado sobre la precisión o la reproducibilidad del 3D real aplicado a la aterosclerosis precoz, donde los métodos 3D precedentes mostraron errores significativos, ni si se aplicara a otros territorios vasculares a parte de las carótidas, siendo la aterosclerosis precoz un estadio en el que aplicar estrategias de prevención alcanzaría un mayor interés.

ESTUDIOS DE REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO DE ECOGRAFÍA VASCULAR 3D REAL			
	Kalashyan et al 2014	Graebe et al 2014	AlMuhanna et al 2015
Tamaño medio de las placas para la validación	440 mm ³ Rango 50 - 1.670 mm ³	380 mm ³ Rango 0 - 1.764 mm ³ (incluyen saños con volumen de placa 0)	1.276 mm ³ Rango 620 - 1.956 mm ³
Tamaño muestral	82 placas carotídeas medidas por 2 observadores	62 placas carotídeas medidas por 2 observadores	10 placas carotídeas medidas por 3 observadores
% Casos no analizables por 3D	33% Placas severamente calcificadas	-	-
Precisión de la medida del volumen de placa por 3D:			
- ICC	-	ICC inter-observador 0.89	ICC inter-observador 0.87 ICC intra-observador 0.95
- Bland-Altman	LoA entre -60 y +70 mm ³ Error medio 5 mm ³	LoA entre -252 y +295 mm ³ Error medio 522 mm ³	LoA entre -500 y +500 mm ³
Comparación con la medida del área de placa por 2D:	-	ICC inter-observador 0.60	ICC inter-observador 0.63 ICC intra-observador 0.92

Tabla 1 Evidencia sobre la reproducibilidad de la medida del volumen de placa por el método de ecografía vascular 3D real

ICC: índice de correlación intraclass

LoA: *limit of agreement* o límite de concordancia

Además, resaltar que el *gold standard* para establecer la precisión *in vivo* de una técnica de imagen en la evaluación de la aterosclerosis es la histología de las placas. Tradicionalmente se han usado piezas de endarterectomía para la correlación de las medidas y composición de las placas con las imágenes obtenidas. También son aceptados los estudios en modelos de experimentación animal, ya que las piezas de endarterectomía limitan la validación de una técnica de imagen a la evaluación de aterosclerosis severa, avanzada o complicada, mientras que en los modelos animales se puede inducir enfermedad aterosclerótica tanto precoz como avanzada o complicada según lo que se busque estudiar.

Respecto a la viabilidad en la práctica clínica del método de ecografía vascular 3D real, sólo el estudio de Kalashyan et al (111) describe la viabilidad de su uso en enfermedad avanzada, observado que la presencia de calcificación severa en un gran número de placas no permitió valorar adecuadamente el 33% de los territorios enfermos, no existiendo estudios sobre la viabilidad del método 3D real en la aterosclerosis precoz a nivel de diferentes territorios vasculares.

Tampoco se ha establecido una estrategia en el estudio de la aterosclerosis con ecografía vascular 3D. Hasta ahora todos los estudios han centrado la adquisición del volumen 3D sobre la placa más representativa del territorio carotideo, sin que nadie hasta ahora haya validado la fiabilidad y reproducibilidad de esta aproximación que parecería *a priori* estar sometida a la subjetividad del operador. De hecho, existe controversia sobre si hay que centrar el estudio en una única placa o estudiar un segmento arterial y todas las placas que en él se incluyan. La primera opción tendría la ventaja de no perder la placa con mayor volumen, con características de vulnerabilidad o con mayor significación del territorio. Sin embargo, estudiar un segmento arterial daría una idea más aproximada de la carga global de aterosclerosis, aunque la placa que pudiera parecer la principal pudiera verse incompleta o no verse. Además, al ser una adquisición

estandarizada, tendría una mayor reproducibilidad entre distintos observadores, vería con mayor precisión la progresión o regresión de la carga de aterosclerosis en el seguimiento, sobre todo si la placa más representativa resulta ser la que menos progresa, y sus resultados serían más fácilmente generalizables a otros centros estableciendo valores de referencia, por ejemplo, en la evaluación del riesgo CV (112).

En conclusión, **hasta ahora no se ha establecido la precisión del nuevo método de ecografía vascular 3D real para la detección y cuantificación de la aterosclerosis precoz *in vitro* y no existe ninguna evidencia de su precisión *in vivo* frente al *gold standard* de la histología. Tampoco se ha determinado su viabilidad, fiabilidad y reproducibilidad si se aplicase una estrategia estandarizada para la detección y cuantificación de la aterosclerosis precoz en la práctica clínica.** Así mismo, no se ha establecido la precisión en la detección y cuantificación del método hasta ahora utilizado del barrido manual 2D/pseudo-3D ni su comparación con el nuevo método de ecografía vascular 3D real.

1.2.4. Situación actual de la ecografía vascular 3D real y justificación del proyecto

Actualmente, están en marcha al menos 3 grandes estudios poblacionales que evaluarán la carga de aterosclerosis mediante la cuantificación del volumen de placa con el método de ecografía vascular 3D real para establecer su asociación con el riesgo CV en múltiples territorios vasculares, como las arterias carótidas y las femorales. El estudio “HRP BioImage study” (100) con 6.000 participantes mayores de 55 años de moderado-alto riesgo, el estudio PESA (94) con 4.000 participantes de entre 40 y 55 años con bajo-moderado riesgo y el AWHS (The Aragon Workers’ Health Study) (113) con 5.000 participantes de moderado riesgo CV. En concreto, el estudio PESA pretende ser el primer estudio en población joven sana que pretende buscar en las nuevas técnicas de imagen no invasiva como el eco vascular 3D real, la posibilidad de entender los factores que favorecen la progresión de la aterosclerosis desde sus

estadios más precoces. Los 3 estudios utilizan la tecnología de la sonda lineal volumétrica VL13-5 y el software *Vascular Plaque Quantification-VPQ*[®] dentro de la aplicación QLAB v10.2[®] (ambos de Philips Healthcare, Andover, MA, USA) que sigue la metodología de ecografía vascular 3D real para la cuantificación y caracterización de la aterosclerosis.

Debido al papel que va a jugar esta nueva técnica en grandes estudios de estratificación del riesgo CV, es prioritario determinar la precisión del nuevo método de ecografía vascular 3D en la cuantificación de la carga de aterosclerosis mediante la medida del volumen de placa, siendo el objetivo principal de la presente tesis doctoral. Para ello, se diseñó un estudio prospectivo con el objeto de validar esta técnica *in vitro* en un modelo de fantomas ecográfico e *in vivo* en un modelo animal usando el *gold standard* de la histología, así como establecer su viabilidad y reproducibilidad en la práctica clínica.

2. HIPÓTESIS

Nosotros hipotetizamos que el nuevo método de ecografía vascular 3D real que utiliza la nueva sonda lineal-volumétrica es:

- 1) Preciso en la detección y en la cuantificación de las placas de aterosclerosis, con especial utilidad en la cuantificación del volumen de las placas pequeñas, presentes en estadios precoces de la enfermedad aterosclerótica.
- 2) Preciso para detectar y cuantificar placas localizadas a diferentes profundidades, análogas a territorios vasculares superficiales, como las arterias carótidas y femorales, y profundos, como las arterias iliacas o la aorta abdominal.
- 3) Más preciso que el método hasta ahora utilizado, el barrido manual 2D/pseudo-3D, para la detección y cuantificación de las placas de aterosclerosis.
- 4) Viable y reproducible en su implementación en la práctica clínica para la detección y cuantificación de placas típicas de estadios precoces del proceso aterosclerótico.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es validar el nuevo método de ecografía vascular 3D real que utiliza la nueva sonda lineal-volumétrica para la detección y cuantificación de placas de aterosclerosis típicas de fases precoces de la enfermedad aterosclerótica en diferentes territorios arteriales. Para cumplir este objetivo establecimos los siguientes objetivos concretos:

- 1) Validar *in vitro* la cuantificación de fantomas que emulan placas ateroscleróticas de diferentes tamaños (con especial énfasis en placas pequeñas) localizadas a diferentes profundidades (emulando diferentes territorios superficiales y profundos) con ecografía vascular 3D real.
 - a) Establecer *in vitro* la precisión de la medida del volumen del fantoma (“placa”) con ecografía vascular 3D real.
 - b) Establecer *in vitro* la influencia del tamaño del fantoma (de “la placa”) en la precisión de la medida del volumen con el fin de determinar su futura aplicación tanto en la aterosclerosis precoz (placas pequeñas focales) como en aterosclerosis moderada-avanzada (placas grandes extensas).
 - c) Establecer *in vitro* la influencia de la profundidad del territorio explorado en la precisión de la medida del volumen con el fin de determinar su futura aplicación tanto en la aterosclerosis de territorios vasculares superficiales (carótidas y femorales) como en profundos (aorta abdominal e iliacas).
- 2) Validar *in vivo* la cuantificación de las placas ateroscleróticas precoces con ecografía vascular 3D real.
 - a) Establecer *in vivo* la precisión de la medida del volumen de placa con ecografía 3D real frente al *gold standard* de la medida en histología en un modelo animal de aterosclerosis precoz.

- b) Comparar la precisión *in vivo* de la ecografía vascular 3D real con la precisión de la medida de la suma de las áreas de la placa por el método tradicional del barrido manual 2D/pseudo-3D evaluada también *in vivo* frente a la medida en histología.
- 3) Establecer un protocolo clínico estandarizado para la detección y cuantificación de la aterosclerosis subclínica precoz centrandó la valoración entorno al bulbo carotideo y a la bifurcación femoral con ecografía vascular 3D real.
- a) Validar la detección de la aterosclerosis precoz carotidea y femoral.
 - i) Establecer la viabilidad del protocolo 3D para la detección de la aterosclerosis precoz y compararla con la viabilidad del protocolo convencional con el método del barrido manual 2D.
 - ii) Establecer la fiabilidad del protocolo 3D para la detección de la aterosclerosis precoz y compararla con la del barrido manual 2D.
 - iii) Establecer la consistencia intra e inter-observador del protocolo 3D para la detección de la aterosclerosis precoz y comprarla con la del barrido manual 2D.
 - b) Validar la cuantificación de la aterosclerosis carotidea y femoral.
 - i) Establecer la reproducibilidad intra e inter-observador de la medida del volumen de aterosclerosis por el protocolo de ecografía 3D real.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

4.1.1. Estudio de validación *in vitro* en un modelo de fantasmas ecográficos

Los fantasmas ecográficos, son modelos anatómicos artificiales que imitan las características anatómicas, así como las propiedades físicas y ecográficas de una estructura o un tejido humano. Su finalidad es simular un escenario que se da *in vivo* pero en un modelo controlado para la variable que se desea validar. El estudio de la precisión de la medida de un método de ecografía mediante fantasmas es un método aceptado y ampliamente utilizado (8).

4.1.1.1 Modelo de fantasmas ecográficos de aterosclerosis

Para nuestro experimento, modelamos unas formas que simularan ser placas de aterosclerosis de diferentes tamaños usando poliuretano. Éstas formas se colocaron en el interior de tubos de silicona de un diámetro interior de 6 mm y un espesor de pared de 0.89 mm simulando una arteria carótida o femoral de dimensiones similar a las de las arterias reales (114) (Figura 5). Finalmente, estas arterias artificiales con las falsas placas en su interior fueron embebidas en un molde de agarosa al 1% (Agarose D1 Low EEO, Laboratorios Conda, Madrid, España) que imitara el tejido circundante de las arterias periféricas humanas (115). El diseño del modelo y el material utilizado en su construcción se basaron en las recomendaciones para la construcción de fantasmas ecográficos así como en otros estudios de validación *in vitro* de técnicas de ecografía vascular (30, 109, 115).

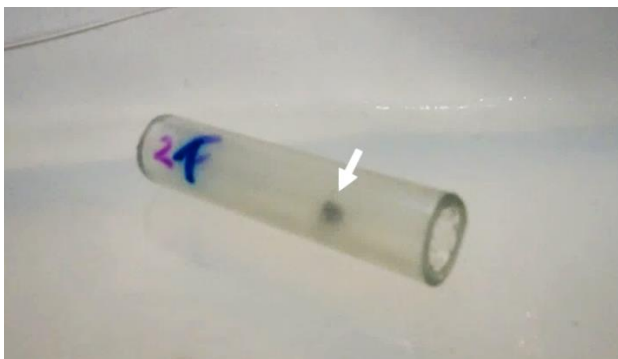


Figura 5 Fantoma de una placa de pequeño tamaño

Aspecto de un fantoma ecográfico simulando una placa pequeña de 6,5mm³ (flecha blanca) dentro de una arteria de intermedio calibre

El volumen de las placas artificiales se calculó dividiendo su peso entre la densidad del material poliuretano siguiendo el principio de física básico en el que el que el volumen es igual a la masa del objeto dividida entre la densidad del material que lo compone. Las placas de poliuretano se pesaron en una báscula digital analítica con una precisión de 0.1mg (desviación estándar 0.1 mg, linealidad 0.2 mg) y con un rango de detección entre 0.1mg y 120g (Precisa XT120A[®], Precisa Gravimetrics AG, Zurich-Oerlikon, Switzerland) para conocer su masa en miligramos (mg). La densidad del poliuretano es de 1.22 mg/mm³ (Sikaflex-1A[®], Sika-Industry, Baar, Switzerland).

Para embeber las arterias artificiales en agarosa a una determinada profundidad, se usó un molde transparente en el que se vertía agarosa preparada con agua caliente destilada a una concentración del 1% formando al enfriarse una cama sólida de 1cm de grosor. Sobre esta primera base se dejaban apoyadas las arterias artificiales y se vertía nuevamente más cantidad de la preparación de agarosa caliente de manera que quedaran inmersas a una profundidad determinada tras solidificarse.

4.1.1.2. Precisión de la medida del volumen en placas pequeñas y la influencia del tamaño de la placa en la precisión de su medición

Se diseñaron 9 fantomas simulando placas de pequeño tamaño. Se consideró placa de pequeño tamaño las menores de 69 mm³, ya que es por debajo de este tamaño cuando se ha demostrado que los métodos antiguos de eco vascular 3D cometen una imprecisión significativa a la hora de cuantificar el volumen de la placa (104, 105, 107). Estos fantomas de placas pequeñas se sumergieron en agarosa quedando a una profundidad de 2cm desde la superficie. Junto a los anteriores, 7 fantomas que simulaban placas de intermedio y gran tamaño (entre 70 y 1000 mm³) se utilizaron para establecer la influencia del tamaño de la placa en la precisión del nuevo método determinando el volumen de aterosclerosis.

4.1.1.3. Influencia de la profundidad de la placa en la precisión de la medición del volumen de la placa

Para estudiar el efecto de la profundidad en la precisión de la cuantificación del volumen con el nuevo método de ecografía vascular 3D, se diseñaron 3 fantasmas siguiendo el protocolo anteriormente descrito, y se embebieron en un molde de agarosa a 3 cm de profundidad, la profundidad habitual a la que las arterias carótidas y femorales se suelen localizar. Este experimento se diseñó con fantasmas de placas pequeñas ($< 69 \text{ mm}^3$) ya que es la cuantificación del volumen de placas pequeñas la determinación más exigente para los métodos de ecografía 3D. Después de que los técnicos en ecografía escanearan los 3 fantasmas localizados superficialmente, se añadió más agarosa al molde para que quedaran embebidos a una profundidad de 5cm, la profundidad mínima a la que se suelen localizar arterias profundas como las iliacas o la aorta abdominal, siendo de nuevo escaneados por los técnicos (Figura 6). Estas distancias se establecieron como las profundidades más frecuentemente encontradas para estos territorios anatómicos en los estudios de ecografía vascular 2D realizadas a los participantes del estudio PESA (94).



Figura 6 Esquema del experimento de profundidad con fantasmas

(A) Fantasmas antes de ser cubiertos por agarosa. Fantasmas embebidos superficialmente en un molde de agarosa a 3cm de profundidad (B) y con mayor profundidad a 5cm (C).

4.1.1.4. Metodología de la ecografía vascular 3D en el experimento de validación *in vitro* con fantasmas ecográficos

El protocolo de ecografía vascular 3D se realizó con un equipo Philips iU22[®] equipado con la sonda lineal volumétrica VL13-5 (Philips Healthcare, Andover, MA, USA). Esta sonda aloja en el interior de su carcasa una guía mecánica del haz de ultrasonidos capaz de hacer un barrido angular automático en forma de abanico, a una velocidad constante, a lo largo de la estructura que se desea evaluar, lo que se ha llamado “barrido interno automático”. De esta manera la distancia entre *frames* es constante y por tanto cuantificable, pudiéndose reconstruir la imagen escaneada como un volumen real desde las 3 dimensiones del espacio. Su adquisición permite programar un barrido angular de entre 10 y 30 grados obteniendo una distancia entre *frames* de entre 0.1 a 0.3 mm o lo que correspondería a barrer un segmento de entre 2 y 6 cm de longitud en unos 2-3 segundos manteniendo en todo momento una posición fija de la sonda. Además trabaja con amplio rango de frecuencias, entre 5 y 13 MHz.

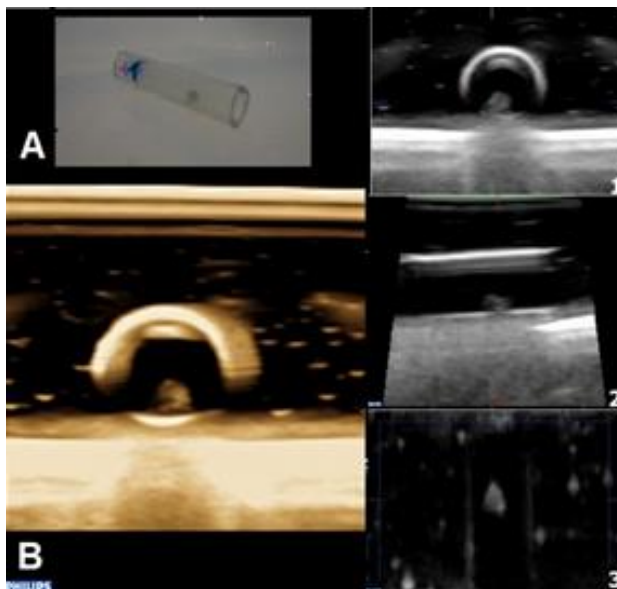


Figura 7 Imagen de ecografía vascular 3D de un fantoma de placa de pequeño volumen

(A) Fantoma de una placa de pequeño tamaño. (B) Reconstrucción volumétrica de la imagen 3D del fantoma adquirido con la sonda lineal-volumétrica. Los paneles 1, 2 y 3 muestran la imagen en los ejes X, Y Z del espacio.

El protocolo de adquisición 3D del experimento *in vitro* con fantasmas ecográficos consistió en un barrido de la imagen de 30 grados. Tras colocar la sonda perpendicular a la estructura a escanear y centrando la imagen en una visión axial del fantoma, se ajusta la

profundidad y la ganancia y se inicia el barrido automático. La adquisición es revisada y aceptada sólo si el fantoma está correctamente centrado en los 3 ejes del espacio (Figura 7).

Las imágenes adquiridas se analizaron con el software semiautomático *Vascular Plaque Quantification-VPQ*[®], herramienta especializada para el análisis vascular 3D real incluida en la aplicación QLAB 10.2[®] (Philips Healthcare, Andover, MA, USA). El software VPQ establece 3 mallas tridimensionales, una sobre la superficie de la placa y su transición con la luz del vaso, otra en el límite definido por la pared interna del vaso o la transición intima-media y otra por la pared externa o la transición media-adventicia, de manera que calcula el volumen de aterosclerosis como el espacio tridimensional comprendido entre la malla de la transición placa-luz y la malla de la pared externa del vaso. Para conseguir estas medidas, el programa simplifica la visualización tridimensional del vaso segmentándolo en cortes axiales consecutivos sobre los que se trazan los límites arriba definidos (Figura 8). El análisis comienza definiendo el *frame* inicial y el final, donde comenzará y terminará el análisis, y varios *frames* intermedios que servirán de guía al programa. Después, con la ayuda de un sistema de detección por escala de grises de las estructuras del vaso, el software automáticamente propaga la segmentación a lo largo de todo el volumen. En ocasiones, esta propagación automática puede verse afectada por la presencia de artefactos o sombras en la imagen, de manera que debe ser revisada y corregida mediante una herramienta que permite ajustar manualmente el trazado a las estructuras. En el análisis de los fantomas se establecieron los *frame* inicial y final a nivel del principio y el final de la imagen de la falsa placa, y un *frame* intermedio donde se visualizaba el espesor máximo de la placa.

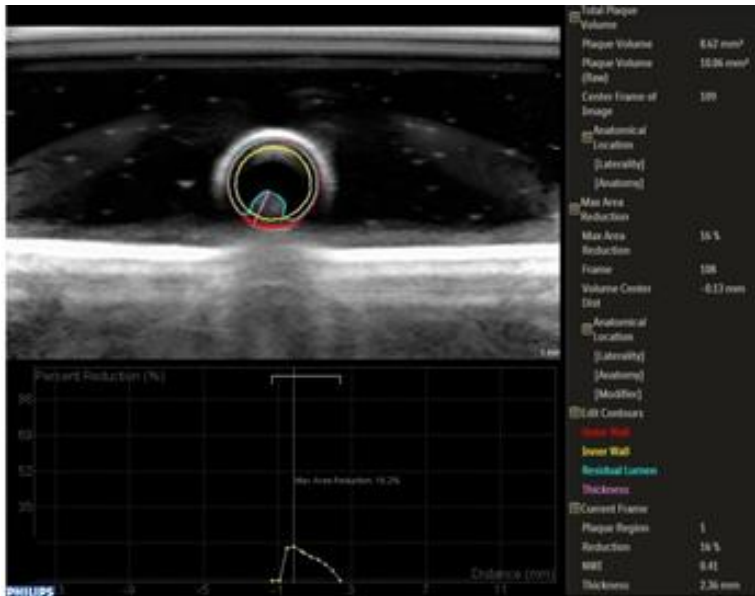


Figura 8 Análisis de las imágenes de ecografía vascular 3D de un fantoma

Delineación semiautomática de las estructuras del fantoma con el software VPQ en una visión de cortes axiales consecutivos. El contorno rojo delimita el borde externo de la pared del falso vaso, el amarillo el borde interno y el verde la transición entre la luz y la superficie de la falsa placa.

4.1.2. Estudio de validación *in vivo* en un modelo animal de aterosclerosis precoz

Con el objeto de validar la precisión en la cuantificación del volumen de placa, y más concretamente, en la cuantificación de volúmenes pequeños equivalentes a un estadio incipiente de la aterosclerosis, elegimos utilizar un modelo animal de aterosclerosis precoz. Aunque el modelo de validación de múltiples técnicas de imagen ha venido siendo su comparación con especímenes de endarterectomía, esto es, utilizando placas grandes, complicadas y obstructivas extraídas durante este proceso quirúrgico, para validar la cuantificación de la aterosclerosis incipiente no sería posible reproducir este tipo de estudios y conseguir especímenes anatomopatológicos de placas pequeñas subclínicas humanas.

4.1.2.1 Modelo animal de aterosclerosis

Elegimos por tanto el modelo de aterosclerosis en conejos de la raza New Zealand White en el que nuestro grupo tiene amplia experiencia para inducir aterosclerosis en diferentes estadios (116-122). La aorta abdominal de un conejo adulto tiene unas dimensiones (aproximadamente entre 6 y 7 mm de diámetro) y se localiza a una profundidad (aproximadamente entre 2 y 3 cm) similar a la de una arteria carótida o femoral humana. La aterosclerosis se indujo en la aorta abdominal mediante un procedimiento de denudación

endotelial con catéter-balón arterial de Fogarty® (4F; Edwards Laboratories, Santa Ana, CA, USA) seguido de una dieta con alto contenido en colesterol (0.2% de colesterol) por un periodo de tiempo de 30 semanas. Con este procedimiento no sólo se induce aterosclerosis localizada en la porción abdominal de la aorta, que es la porción más adecuada para el estudio de imagen tanto con eco vascular como con otras técnicas de imagen e histología en este tipo de animales, sino que además, éstas tendrían una composición similar a la aterosclerosis precoz humana en cuanto a que son placas con un componente tanto lipídico como fibroso, así como con un cierto grado de calcificación, como se describe en las experiencias publicadas con anterioridad por nuestro grupo con este modelo (117, 118). La presencia de cierto grado de calcificación es un componente importante para establecer, lo más aproximadamente posible a la realidad de la aterosclerosis humana, la precisión del método 3D, por ello, además del análisis de la composición en las muestras histológicas, también se determinó el volumen de calcio que se había conseguido generar con la inducción de la aterosclerosis en la aorta de los conejos utilizando el método del score de calcio convencional de Agatston con TAC de 64 cortes (Brilliance®, Philips Healthcare, Andover, MA, USA).

4.1.2.2. Colocalización de las placas a estudio por imagen ecográfica e histología

Para cumplir con el objetivo de determinar la precisión de la medida del volumen de placa con 3D frente a su medición por histología, quisimos asegurar que el análisis de imagen y el de la histología colocalizaban y eran exactamente de la misma placa. Para ello limitamos la muestra de nuestro experimento a las placas que se identificaron con ecografía 3D al final del protocolo, en la semana 30, por su localización específica a nivel del segmento de aorta que delimitan el origen de las arterias renales izquierda y derecha, ya que, el origen de las arterias renales, es un punto anatómico de referencia fácilmente reconocible y reproducible en el modelo de conejo tanto para el estudio con técnicas de imagen como para su colocalización en el espécimen anatomopatológico (Figura 9). Se identificaron un total de 9 placas a nivel del

segmento inter-renal que fueron incluidas en el experimento. Primero todas ellas fueron estudiadas con los métodos de ecografía vascular 2D/pseudo-3D y 3D real. Una vez terminados los estudios de imagen, los animales fueron sacrificados y su aorta extraída y fijada en formalina tamponada al 10% por un tiempo mínimo de 24 horas. Una vez fijadas las piezas anatómicas, se identificó el segmento inter-renal para ser embebido en parafina. Posteriormente se hicieron secciones histológicas de este segmento transversales consecutivas de un grosor de corte de 4µm cada 0.2 mm de distancia entre secciones, imitando la distancia entre *frames* de 0.2 mm a cómo fueron adquiridas las imágenes de las placas con la ecografía vascular 3D real. La tinción usada para la visualización de las secciones histológicas fue hematoxilina-eosina. Las secciones obtenidas fueron digitalizadas para su posterior análisis utilizando un microscopio con cámara digital de alta resolución incorporada.

Los procedimientos pre-clínicos correspondientes a la validación en un modelo animal se incluyeron dentro de un proyecto aprobado por la CAM ES28079000176 para testar la eficacia de un nuevo fármaco frente a la aterosclerosis cuyo investigador principal es el Dr. Borja Ibáñez y se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - CNIC que cumplen la normativa vigente relativa a bienestar animal (RD 53/2013 de 1 de febrero). Todos los investigadores implicados en el proyecto velaron por el cumplimiento de todas aquellas normas que competen al bienestar animal durante los procedimientos señalados en la misma (RD 53/2013 de 1 de febrero) y todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo por personal acreditado para trabajar con animales de experimentación (categorías B, C y D) y avalados por entidades de carácter nacional.

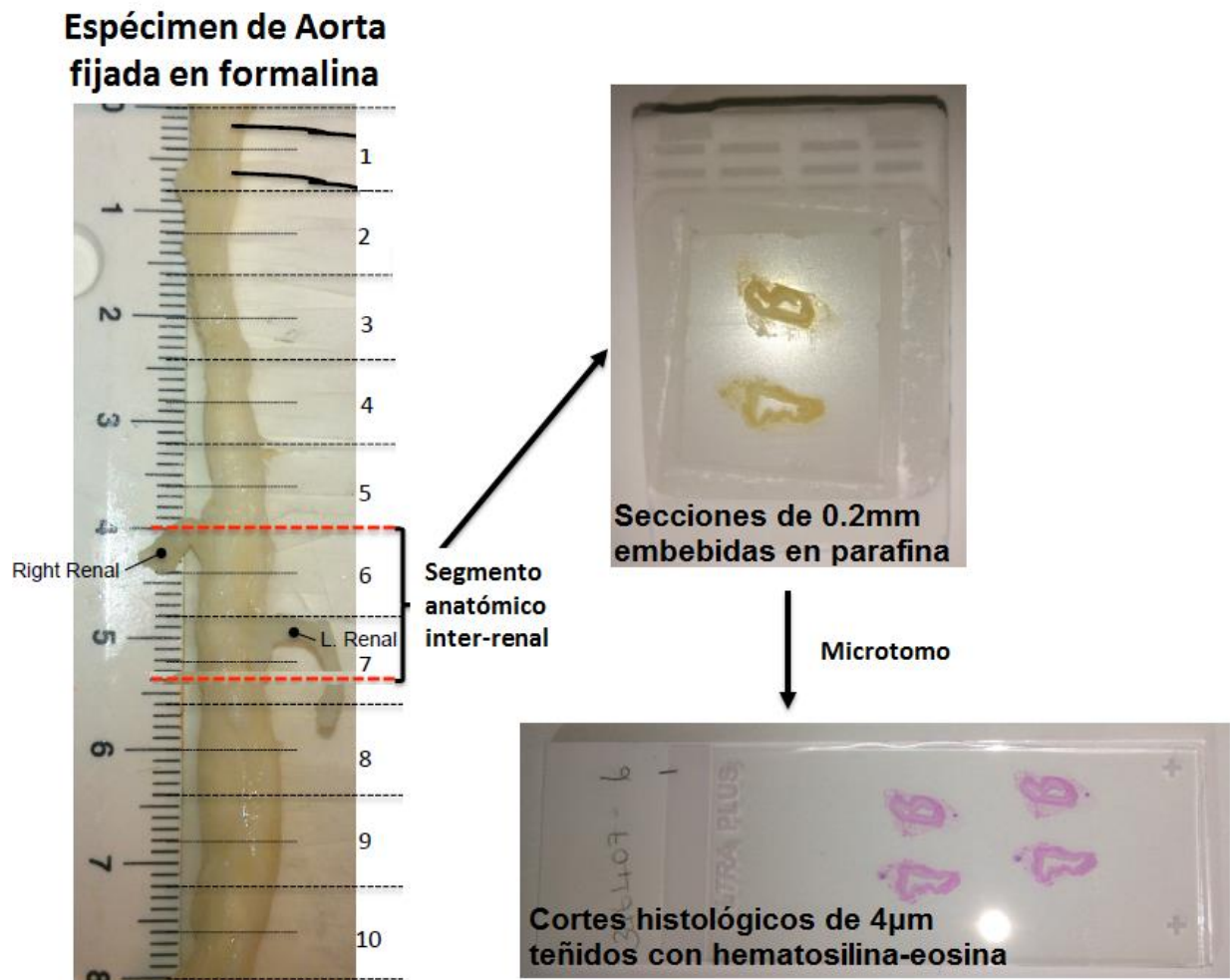


Figura 9 Esquema del procesamiento de las muestras de histología para el experimento de validación *in vivo*

Espécimen de aorta abdominal completo tras ser fijado con formalina y colocado con una orientación cráneo-caudal. Se identifican las referencias anatómicas del borde superior del origen de la arteria renal derecha y el borde inferior del origen de la arteria renal izquierda de los animales donde se encontró la presencia de placa por ecografía en esta región. El segmento inter-renal embebido en parafina se procesó en cortes trasversales cada 0.2 mm con un grosor de corte de 4 µm.

El diseño general del estudio validación *in vivo* se resume en la (Figura 10).

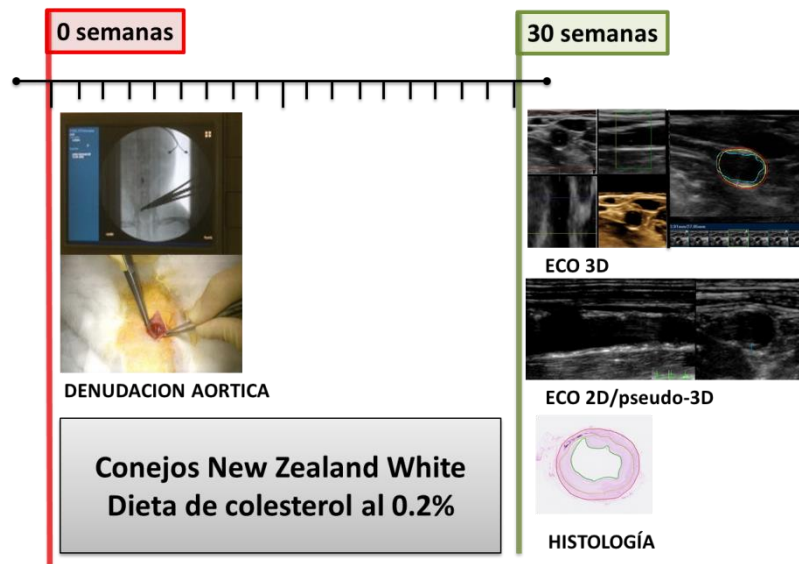


Figura 10 Esquema del diseño del estudio de validación *in vivo*

4.1.2.3. Ecografía vascular 2D/pseudo-3D y 3D real para la detección y cuantificación *in vivo* de la aterosclerosis precoz en el modelo de conejo

Para la realización de las ecografías los conejos fueron sedados con Ketamina (10 mg/kg IM) y Xilacina (2.5 mg/kg IM) y colocados en posición decúbito supino sobre la camilla de exploración con el vientre afeitado y la señal de ECG con registro simultaneo (Figura 11). Para la adquisición 2D/pseudo-3D se utilizó la sonda lineal vascular de alta frecuencia Lio 9-15 (Philips Healthcare, Andover, MA, USA). La adquisición consistía en un barrido manual de la aorta abdominal en una vista axial continuada de 10 segundos de duración, desde el origen del tronco celiaco hasta la bifurcación iliaca incluyendo el segmento inter-renal y manteniendo una velocidad constante al desplazar la sonda. En el protocolo 2D también se incluyó la evaluación de las condiciones fisiológicas en las que se realizó el estudio vascular, recogiendo la frecuencia cardiaca y la tensión arterial de animal durante el estudio, así como un registro de doppler espectral para determinar tanto las velocidades sistólica pico, telediastólica y media con las que calcular el índice de resistencia de Pourcelot (123) y el índice de pulsatilidad de la arteria

descrito por Gosling y King (124). Para la adquisición 3D real se utilizó la sonda VL 13-5 estableciéndose un protocolo que consistió en un barrido automático de 30 grados axial a la aorta abdominal centrado en el origen de la arteria renal izquierda y paralela al eje longitudinal de la aorta (Figura 12A). Por lo tanto, la adquisición 3D también incluyó el segmento interrenal con el origen de ambas arterias renales. La adquisición se realizó automáticamente en unos 2 segundos desde la posición fijada. El volumen adquirido fue revisado y aceptado sólo si el vaso estaba correctamente centrado en los 3 ejes de espacio y no presentaba artefactos de movimiento o sombras ecográficas por interposición del gas abdominal. Las adquisiciones de ecografía fueron realizadas por el mismo operador en todos los animales con el fin de mantener unas condiciones estables entre los estudios, sobre todo para optimizar la reproducibilidad de mantener una velocidad constante entre los estudios de adquisición manual 2D/pseudo-3D.

El análisis se realizó fuera de línea (*off-line*) en una estación de trabajo Xcelera[®] (Philips



Figura 11 Preparación para la realización de la ecografía vascular en un conejo New Zealand White

Healthcare, Andover, MA, USA) a la que se transfirieron los estudios desde el equipo de ecografía. Las imágenes adquiridas con el método 2D/pseudo-3D se analizaron con el software de análisis QLAB v10.2[®] (Philips Healthcare, Andover, MA, USA) que muestra el barrido axial 2D *frame a frame* permitiendo medir las áreas consecutivas de cada placa en mm². El diagnóstico de placa de aterosclerosis se definió, siguiendo los criterios de consenso

internacional, como la protrusión de la pared arterial en la luz del vaso mayor del 50% del grosor íntima media (8, 22). El volumen pseudo-3D de una placa se estimó sumando todas las áreas consecutivas visualizadas en el barrido obteniendo así una estimación de la carga de placa o pseudo-volumen de placa en mm². Las imágenes adquiridas por el método 3D real fueron analizadas siguiendo la metodología explicada para el experimento *in vitro* con el software especializado de análisis *Vascular Plaque Quantification-VPQ*[®], estableciéndose los *frame* inicial y final a nivel del principio y el final del segmento inter-renal aórtico, donde se localizaban las placas, y por tanto coincidiendo con el inicio y final de la placa en el mismo segmento histológico, y el *frame* intermedio se estableció donde se visualizaba el espesor máximo de cada placa (Figura 12B). Un cardiólogo con experiencia en ecografía cardiovascular y en ecografía de modelos animales, analizó y midió los estudios 2D/pseudo-3D y 3D real siendo ciego al análisis de los datos histológicos.

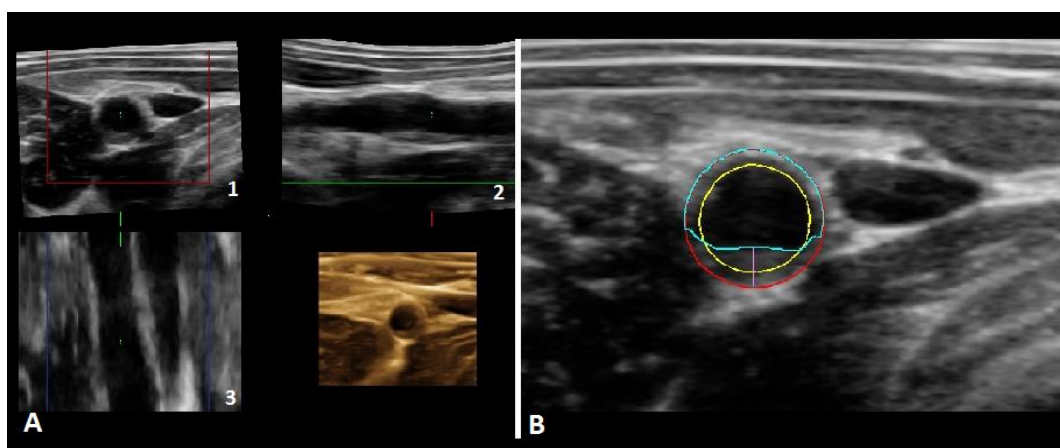


Figura 12 Adquisición y análisis 3D de la aorta abdominal del conejo

Adquisición 3D real de la aorta de un conejo centrado en una visión axial a nivel del segmento inter-renal (A). Los paneles 1, 2 y 3 muestran la aorta abdominal en los 3 ejes del espacio. En color dorado aparece la reconstrucción 3D volumétrica. Análisis de la adquisición 3D con la herramienta VPQ sobre una visión de cortes axiales consecutivos del vaso (B). El contorno rojo delimita el borde externo de la pared del vaso o la transición media-adventicia, el amarillo el borde interno o la transición íntima-media y el verde la superficie de la placa.

4.1.2.4. Cuantificación de la aterosclerosis en las muestras de histología

El análisis de las muestras histológicas se realizó con el software *NDPviewer*[®] (*NDP.view2* Hamamatsu Photonics, UK). Este software permite un análisis por planimetría de

las secciones histológicas de la placa. En amarillo se trazó el borde interno de la capa media arterial, en rojo la transición media-adventicia y en verde la luz residual del vaso obteniendo así 3 áreas por cada sección, el área interna, el área intermedia y el área externa del vaso (Figura 13). Se calcularon los siguientes parámetros: el área de la luz del vaso equivalía al área interna, el área de placa es la resultante de restar al área intermedia el área interna y el área de pared del vaso es la resultante de restar al área externa el área interna de una manera similar a como se analizan las imágenes del 3D real corte a corte. De los datos de las secciones histológicas consecutivas de cada placa se obtuvo la determinación de la suma de las áreas de placa en mm^2 . El volumen de placa en mm^3 se obtuvo multiplicando la suma de las áreas por la distancia entre las secciones.

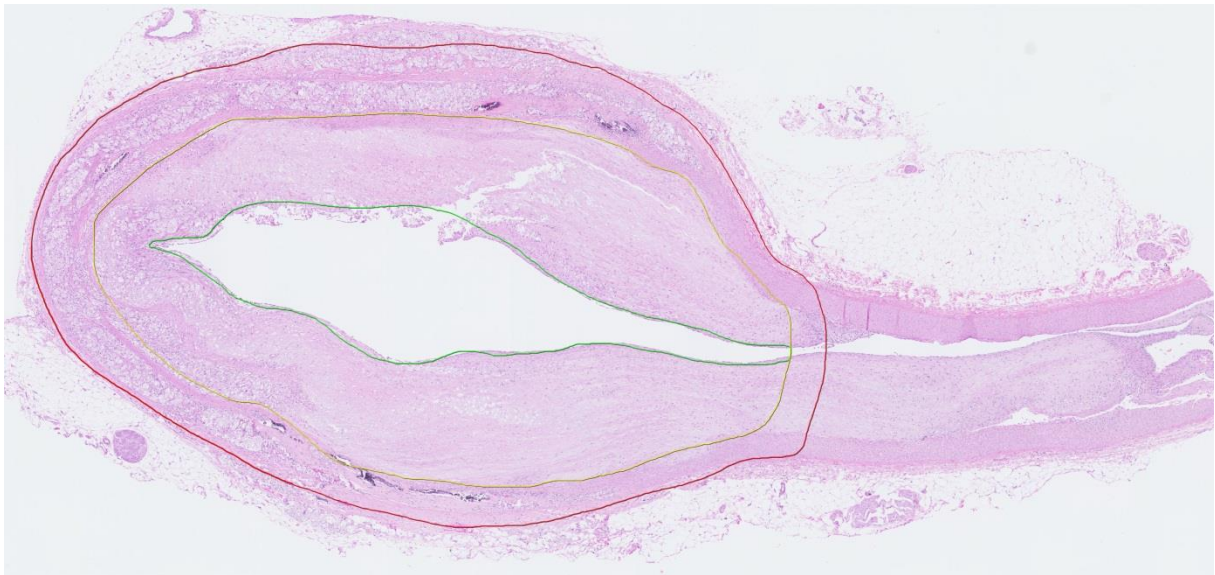


Figura 13 Análisis por planimetría de las secciones histológicas de placa

Análisis de un corte histológico de la aorta de un conejo con una placa concéntrica. La placa se localiza englobando el ostium de la arteria renal izquierda, punto anatómico de referencia elegido para colocalizar el análisis histológico y de imagen. En rojo se delimita la transición media adventicia, en amarillo el borde interno de la capa media y en verde la luz residual.

4.1.3. Estudio de validación clínica en un grupo de participantes de mediana edad libres de enfermedad cardiovascular

Con el objeto de proponer un protocolo estandarizado para el nuevo método de ecografía vascular 3D real, establecer su viabilidad y reproducibilidad así como compararlo con el método tradicional de ecografía 2D en la evaluación de la aterosclerosis subclínica precoz, se diseñó este estudio de validación dentro del estudio PESA-CNIC-Santander.

4.1.3.1. Estudio PESA

El estudio PESA es un estudio de cohortes observacional prospectivo que ha reclutado 4.184 voluntarios de entre 40 y 55 años de edad trabajadores del Banco de Santander en Madrid. Su objetivo principal es caracterizar la presencia y distribución de la carga de aterosclerosis subclínica precoz así como determinar los factores que influyen en su progresión a lo largo de un seguimiento programado de 6 años (94). Los participantes se eligen por su edad tras descartar que no tengan enfermedad cardiovascular establecida, por lo que *a priori*, su perfil de riesgo es entre bajo y moderado según las escalas de riesgo tradicionales. El seguimiento se divide en 3 visitas: basal, a los 3 y a los 6 años del reclutamiento, en los que se estudia la presencia y la carga de aterosclerosis en diferentes territorios vasculares (Figura 14). En cada visita, los participantes son estudiados con diferentes técnicas de imagen no invasiva como la ecografía vascular 2D y 3D, y se estudia su score de calcio coronario con TAC. Con ecografía vascular 2D se evalúan las arterias carótidas, ilíacas y femorales así como la aorta abdominal infrarrenal para detectar la presencia de placas de aterosclerosis en estos territorios. Con 2D también se determinan los índices del grosor íntima-media carotídeo y femoral. Con el método de ecografía 3D real el estudio se limita a las arterias periféricas superficiales, arterias carótidas y femorales. En el estudio 3D no solo se detecta la presencia de placas sino que también se cuantifica el volumen de placa como medida de la carga de enfermedad aterosclerótica. Cada

visita se completa con un examen físico, una extracción analítica y una entrevista para registrar tanto la presencia de factores de riesgo convencionales (hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia y tabaquismo) como no convencionales (índices antropométricos, nuevos marcadores bioquímicos, hábitos de vida: dieta, ejercicio, sueño, estrés y un cuestionario socioeconómico). El estudio PESA además estudiará con técnicas de imagen avanzada, en concreto con tecnología híbrida de PET-RM con 18F-FDG, a una submuestra que incluirá a aproximadamente 1.000 participantes que presentan la mayor carga de aterosclerosis evaluada mediante las técnicas de imagen básica, para caracterizar la aterosclerosis desde el punto de vista de la composición y el grado de inflamación que presentan las placas detectadas.

Los procedimientos correspondientes al estudio de validación en una cohorte clínica del método de ecografía vascular 3D se incluyeron dentro del estudio clínico del PESA-CNIC-Santander con referencia NCT01410318 cuyo investigador principal es el Dr. Valentín Fuster y se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III – CNIC en colaboración con los servicios médicos de la ciudad financiera del Banco Santander en Boadilla del Monte, Madrid. Este proyecto tiene la aprobación del comité ético del instituto Carlos III, se dispone del consentimiento informado de sus participantes y cumple con la normativa vigente señalada en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD).

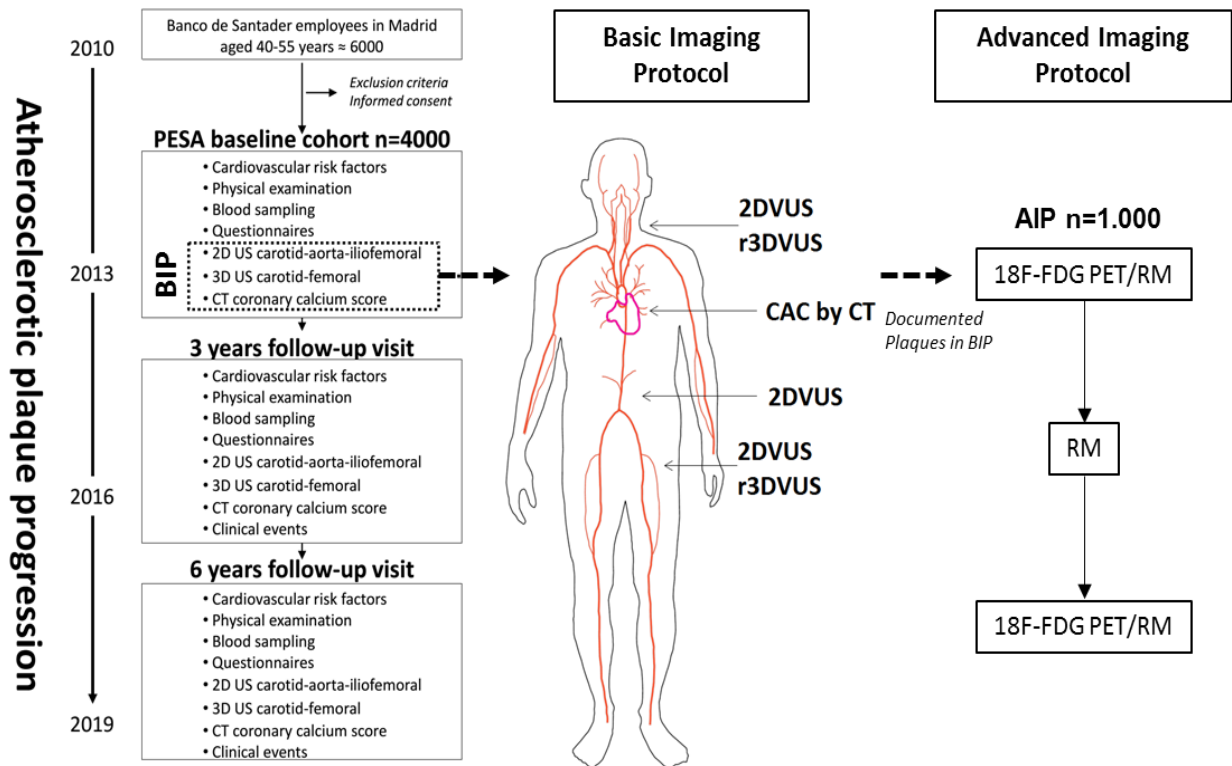


Figura 14 Diseño general del estudio PESA

BIP: *Basic Imaging protocol* o protocolo de imagen básica. AIP: *Advanced imaging protocol* o protocolo de imagen avanzada. 2DVUS: ecografía vascular 2D. r3DVUS: ecografía vascular 3D real. CAC: calcio coronario determinado por tomografía computarizada. 18F-FDG: radiotrazador 18-fluorodesoxiglucosa. PET/RM: tecnología híbrida de tomografía por emisión de positrones y resonancia magnética.

4.1.3.2. Diseño del estudio para la determinación de la reproducibilidad y viabilidad de la ecografía vascular 3D real y su comparación con el barrido manual 2D

De entre la cohorte basal completa del estudio PESA se seleccionó aleatoriamente un subgrupo de 32 participantes obteniendo así una muestra de 128 territorios vasculares, 64 carótidas y 64 femorales, estudiados con ecografía real 3D junto con sus correspondientes estudios 2D. Los estudios de ecografía 3D fueron analizados de manera independiente de los estudios 2D por 3 técnicos con experiencia en ecografía vascular. En el análisis de los estudios 3D se estableció la presencia o ausencia de placa en el territorio y el volumen total de placa

visualizado. Los estudios 2D fueron analizados por 3 radiólogos con experiencia en ecografía vascular ciegos al análisis 3D. En el análisis 2D se estableció la presencia o ausencia de placa en el territorio explorado.

En primer lugar se buscó determinar la viabilidad del protocolo de ecografía 3D real propuesto para la detección y cuantificación precoz de la carga de aterosclerosis en los participantes del estudio PESA, un protocolo diseñado para ser extrapolable a los estudios de cribado poblacional de individuos jóvenes o de mediana edad de bajo-moderado riesgo cardiovascular. Para ello se tomaron los análisis de ecografía 3D de los 128 territorios seleccionados y se determinó la calidad del estudio, señalándose si la ventana ecográfica fue buena, pobre pero susceptible de poder ser analizada o si la calidad de la adquisición no era válida para analizar con confianza la presencia de placas de aterosclerosis. Este análisis de la ventana ecográfica y viabilidad del análisis se realizó igualmente en los estudios de ecografía 2D para su comparación con la viabilidad del 3D.

Como parte del análisis de viabilidad, también se estableció la utilidad de la herramienta semiautomática para el análisis de las adquisiciones 3D. Para ello se determinó en cuantos estudios se precisó corregir manualmente el trazado semiautomático y las características morfológicas de las placas o la presencia de artefactos por las que el análisis semiautomático falló y tuvo que ser corregido manualmente. Las características se definieron como: placas hipoecogénicas o “blandas” son aquellas placas con una apariencia negra similar a la intensidad de la sangre, placas complejas son aquellas cuya morfología es muy irregular con posibles defectos en su superficie y placas severamente calcificadas las que causaban sombras o ecos posteriores limitando la visualización de la placa al completo.

En segundo lugar se buscó determinar la reproducibilidad de la ecografía 3D real tanto en la detección de la presencia de placa como en la medida del volumen de aterosclerosis en

los 128 territorios vasculares conjuntamente y por separado en las carótidas y en las femorales. La reproducibilidad inter-observador se estableció comparando la detección y el volumen de aterosclerosis medido por los 3 técnicos de ecografía. La reproducibilidad intra-observador se estableció comparando la detección y el volumen de aterosclerosis que había determinado el mismo técnico en 2 lecturas, separadas de 1 mes entre la primera y la segunda, para evitar la familiaridad de las imágenes. Así mismo, se determinó la reproducibilidad de la ecografía 2D para la detección de la presencia de placas de aterosclerosis intra e inter-observador entre los 3 radiólogos especialistas. Finalmente se buscó establecer una comparativa entre la reproducibilidad de la ecografía 3D y la ecografía 2D para la detección de la presencia de placas de aterosclerosis subclínica precoz.

4.1.3.3. Metodología de la ecografía vascular 2D y 3D real para la detección y cuantificación de la aterosclerosis precoz de carótidas y femorales en el subgrupo de participantes del estudio PESA

La ecografía vascular se realizó, al igual que en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, con un equipo Philips iU22[®] (Philips Healthcare, Andover, MA, USA) equipado con la sonda lineal volumétrica VL 13-5 para la exploración 3D real y una sonda lineal L9-3 para la exploración en 2D de los territorios carotideo y femoral. El protocolo de adquisición de ecografía 2D consistió en un barrido manual del territorio a explorar en una vista axial continuada de 10 segundos de duración manteniendo una velocidad constante cuando el operador desplaza la sonda. En las carótidas, el barrido se obtenía comenzando en la carótida común medio-distal hasta los segmentos proximales de las ramas interna y externa (Figura 15A). En las femorales, el barrido comenzaba en la femoral común medio-distal y terminaba en los segmentos proximales de las ramas superficial y profunda. Para confirmar la presencia de una placa, también se adquirirían imágenes de cine durante 3 latidos en una visión longitudinal y ortogonal del vaso a nivel de la placa (Figura 15B). Las imágenes adquiridas con este método se

analizaron con el software de análisis QLAB v10.2[®] (Philips Healthcare, Andover, MA, USA) y la presencia de placa de aterosclerosis se definió, igualmente siguiendo los criterios de consenso internacional, como la protrusión de la pared arterial en la luz del vaso mayor del 50% del grosor íntima media o un engrosamiento difuso >1.5 mm del IMT (8, 22).

El protocolo de adquisición estandarizado de ecografía 3D real para las arterias carótidas consistió en un barrido automático de 30 grados colocando la sonda perpendicular al eje axial (eje x) y paralelo al eje longitudinal (eje y) del vaso realizando pequeños movimiento de barrido a lo largo del cuello. Una vez localizada la posición correcta, se centraba la sonda de nuevo en una visión axial del bulbo carotideo, se ajustaba la profundidad y la ganancia, se pedía al participante que no se moviera y que no tragara, activando entonces el barrido automático de unos 2 segundos de duración y sin mover la sonda de la posición fijada. La adquisición 3D obtenida, por tanto, consistía en un volumen de 6 cm de longitud en el eje z o lateral que incluía la carótida común medio-distal, el bulbo, la bifurcación y el segmento proximal de las ramas interna y externa (Figura 15C). El volumen adquirido era revisado y aceptado sólo si el vaso estaba correctamente centrado en los 3 ejes de espacio y no presentaba artefactos de movimiento. Para el territorio femoral, el barrido se centraba en una visión axial de la bifurcación femoral, por tanto, consistía en un volumen de 6 cm de longitud en el eje z o lateral que incluía la femoral común medio-distal, la bifurcación y el segmento proximal de las ramas superficial y profunda (Figura 16A).

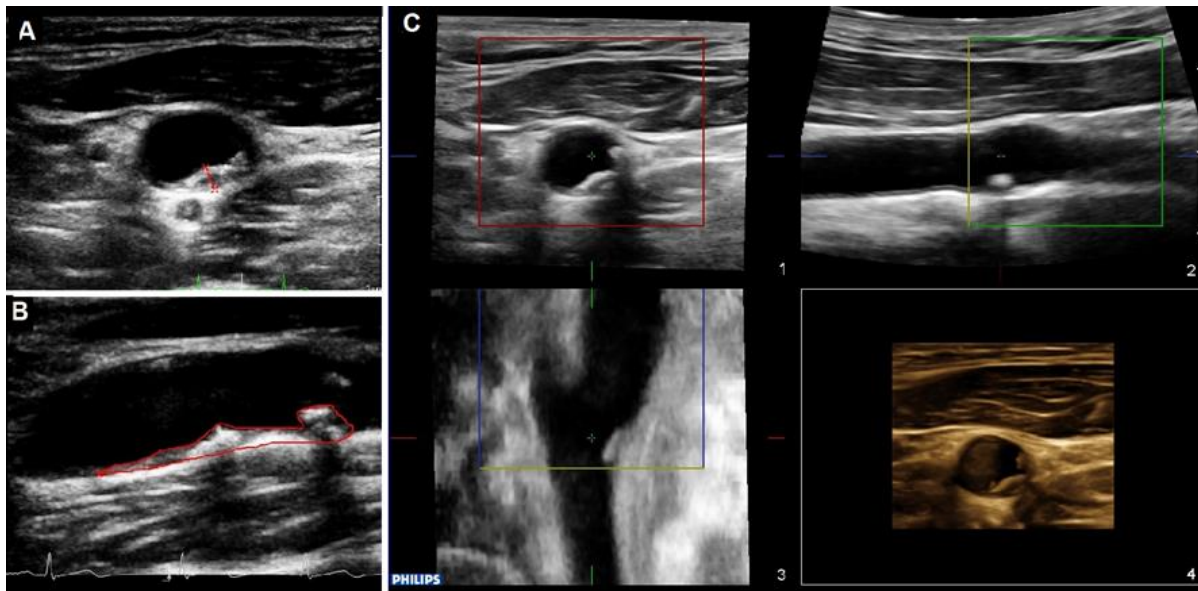


Figura 15 Adquisición 2D y 3D de una placa en la arteria carótida izquierda

Adquisición 2D en una visión axial (A) y longitudinal (B) de una placa a nivel del bulbo carotideo. Adquisición de la misma placa en 3D real (C), los paneles 1, 2 y 3 muestran la arteria carótida en los 3 ejes del espacio y el panel 4 es una reconstrucción volumétrica del bulbo con la placa en una visión axial.

La adquisición 3D fue analizada con el software *Vascular Plaque Quantification-VPQ*[®] siguiendo la metodología explicada para el experimento *in vitro* e *in vivo*, estableciéndose los *frame* inicial y final a nivel del principio y el final del volumen completo adquirido, y varios *frames* intermedios donde se visualizaba placa (Figura 16B). Para la definición de la presencia de placa se tomaron los mismos criterios de consenso que para la ecografía vascular 2D. La carga de aterosclerosis o volumen de aterosclerosis global de un participante se definió como el volumen de aterosclerosis resultante de sumar todos los volúmenes de placas visualizadas en las adquisiciones estandarizadas de ambas carótidas y femorales en ecografía 3D real. También se definió por separado el volumen de aterosclerosis carotideo sumando todos los volúmenes de placa visualizados en las adquisiciones de ambas carótidas, y el volumen de aterosclerosis femoral sumando todos los volúmenes de placa visualizados en las adquisiciones de ambas femorales de un individuo.

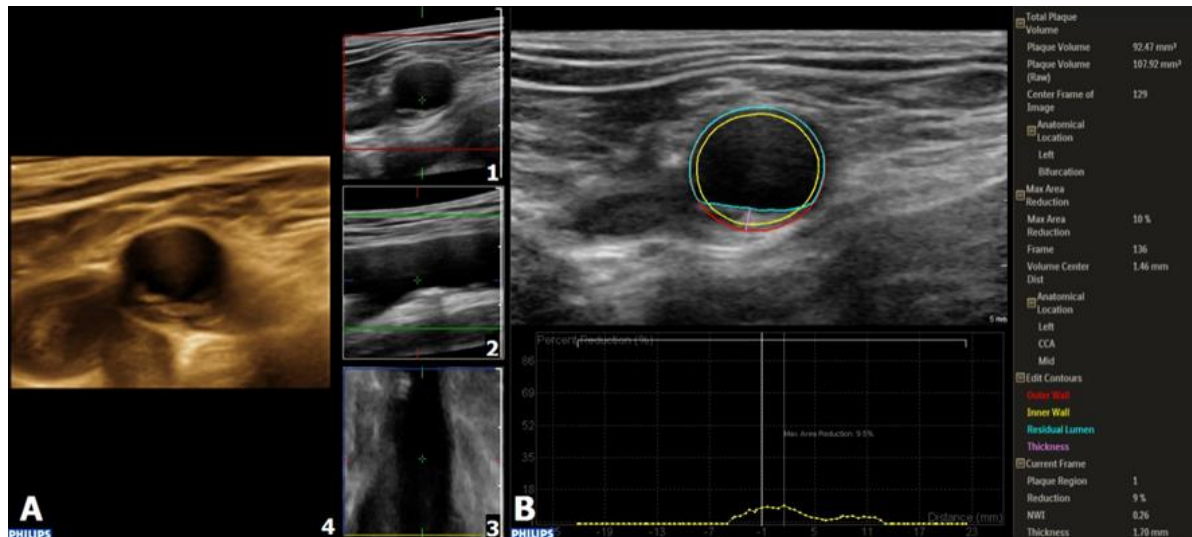


Figura 16 Adquisición y análisis 3D de una placa en la arteria femoral izquierda

Adquisición 3D de una placa en la bifurcación de la arteria femoral izquierda (A). Los paneles 1, 2 y 3 muestran la arteria femoral en los 3 ejes del espacio y el panel 4 es una reconstrucción volumétrica de la bifurcación con la placa en una visión axial. Análisis de la adquisición 3D con la herramienta semiautomática VPQ sobre una visión de cortes axiales consecutivos del vaso (B). La placa detectada tiene un volumen de 107.92mm³ y genera una estenosis máxima del 9.5%. El contorno rojo delimita el borde externo de la pared del vaso o la transición media-adventicia, el amarillo el borde interno o la transición intima-media y el verde la superficie de la placa.

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.2.1. Estudio de validación *in vitro*

El estudio de la precisión de la medida del volumen *in vitro* se realizó comparando el volumen real de la placa del fantoma (masa dividido entre densidad) frente al volumen medido en la adquisición de ecografía 3D.

Inicialmente se determinó la correlación entre las 2 medidas mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r). Para ello, se tomó como volumen medido en 3D la media de los volúmenes leídos por los 3 observadores para cada fantoma, ya que de esta manera se permite minimizar cualquier posible error sistemático atribuido a la propia lectura. Así mismo, la variabilidad de dicha lectura inter-observador se valoró con la desviación estándar de la media entre las 3 medidas.

La precisión entre el volumen real y el volumen medido por los 3 observadores se estableció con el coeficiente de correlación intraclase. Éste índice permite estimar el promedio de las correlaciones entre todas las posibles ordenaciones de los pares de observaciones disponibles y, por lo tanto, evita el problema de la dependencia del orden del coeficiente de correlación r , y además extiende su uso al caso en el que se disponga de más de dos observaciones por sujeto, no ocurriendo así con el coeficiente r en el que sólo se comparan 2 observaciones.

Los límites de concordancia y la visualización de forma gráfica de las posibles discrepancias entre el volumen medido frente al volumen real se evaluaron mediante la distribución de las diferencias entre ambas medidas en una gráfica de Bland-Altman.

4.2.2. Estudio de validación *in vivo*

Para el análisis de las condiciones fisiológicas en las que se realizaron los estudios de ecografía vascular, la distribución de las variables continuas se resumió como media \pm 1 desviación estándar (DS).

Inicialmente se estableció la correlación entre la medida del volumen real de placa por el método de ecografía 3D con el volumen de placa medido por el *gold standard* de la histología mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson r , la precisión con el coeficiente de correlación intraclase y los límites de concordancia así como la visualización de las posibles discrepancias en una gráfica de Bland-Altman.

Del mismo modo, se estableció la correlación entre la medida de la suma de las áreas de placa, o pseudo-volumen, por el método de ecografía 2D/pseudo-3D con la suma de las áreas de placa por histología mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson r , la precisión con el coeficiente de correlación intraclase y los límites de concordancia y discrepancias en una gráfica de Bland-Altman.

4.2.3. Estudio de validación clínica

Para el análisis de la viabilidad del método 3D real, la distribución de las variables continuas se resumió como media \pm 1 desviación estándar (DS) para distribuciones normales y como mediana y rango para distribuciones no normales. Las variables categóricas se expresaron como número absoluto y porcentaje. De igual modo se analizó la viabilidad del método tradicional del barrido manual 2D.

Para analizar primero la fiabilidad, y segundo, la consistencia en el diagnóstico de la presencia de aterosclerosis del nuevo método de ecografía 3D real y compararlo con el método tradicional del barrido manual 2D, se calcularon los índices de concordancia *kappa* de Cohen para variables categóricas. Para lo primero, se evaluó la concordancia al establecer el diagnóstico de la presencia de placa en un mismo estudio o territorio arterial evaluado por los 2 métodos, el 3D real y el barrido manual 2D. Para lo segundo, se evaluó la concordancia en el diagnóstico de presencia de placa entre distintos observadores utilizando ambos métodos, el 3D real y el 2D.

Para el análisis de reproducibilidad, se calculó el índice de correlación intraclass y se representaron en una gráfica de Bland-Altman las diferencias entre las mediciones del volumen de placa realizadas por los 3 observadores comparados 2 a 2 para la variabilidad inter-observados y las diferencias de cada uno consigo mismo en medidas repetidas separadas de 1 mes para la variabilidad intra-observador. Para el análisis de reproducibilidad se utilizó la medida del volumen global de aterosclerosis o suma de los volúmenes de todas las placas visualizadas en las adquisiciones estandarizadas de carótidas y femorales en un individuo. También se determinó la influencia del territorio en la reproducibilidad de la medida analizando el volumen de aterosclerosis medido en el territorio carotideo y el del femoral por separado.

El análisis estadístico se realizó con el programa Stata12 (StataCorp LP, Texas, USA). Se consideraron significativos aquellos valores obtenidos de $p < 0.05$. Para los índices ICC y *kappa*, se consideró una buena precisión para los valores > 0.70 y una precisión excelente para los valores > 0.90 . En las gráficas de Bland-Altman se representó el error medio de las diferencias entre las medidas del volumen y los límites de concordancia calculados como el error medio ± 1.96 DS.

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN *IN VITRO*

5.1.1. Resultados generales de la precisión de la medida del volumen con el método de ecografía vascular 3D real

Todos los fantasmas diseñados, tanto para el experimento de la influencia del tamaño como para el de la influencia de la profundidad, fueron escaneados y posteriormente analizados para la obtención de la medida del volumen por los 3 técnicos con éxito.

5.1.2. Influencia del tamaño de la placa en la precisión de la medida del volumen

El volumen real de los fantasmas de pequeño tamaño diseñados para este experimento fue de $22 \pm 19.7 \text{ mm}^3$ (rango 3.03 - 64.5 mm^3) y el volumen medido con el método 3D fue de $24 \pm 18.7 \text{ mm}^3$ (rango 3.9 - 60.8 mm^3). La precisión en la medición de volúmenes de placa pequeños con este método fue excelente con un índice de correlación intraclase (ICC) de 0.99 y un índice de correlación r de 0.992 ($p < 0.001$) (Figura 17).

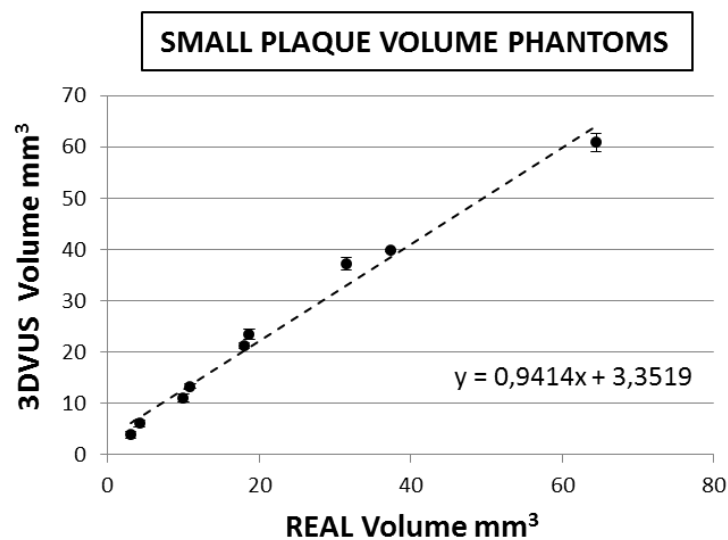


Figura 17 Correlación entre el volumen medido en ecografía 3D y el volumen real en fantasmas de placas pequeñas

Línea de tendencia. Cada medida es la media de 3 observaciones, la desviación estándar de las 3 medidas se muestra con las barras de error.

3DVUS Volume: Volumen medido por el método de ultrasonido vascular 3D. REAL Volume: Volumen real del fantoma.

El volumen real de los fantasmas de tamaño intermedio-grande fue de $351.6 \pm 306 \text{ mm}^3$ (rango $91.1 - 965.5 \text{ mm}^3$) y el volumen medido con el método 3D fue de $398.3 \pm 323.4 \text{ mm}^3$ (rango $121.3 - 1037.2 \text{ mm}^3$), mostrando también una precisión excelente con un ICC de 0.98 y una correlación r de 0.999 ($p < 0.001$) (Figura 18).

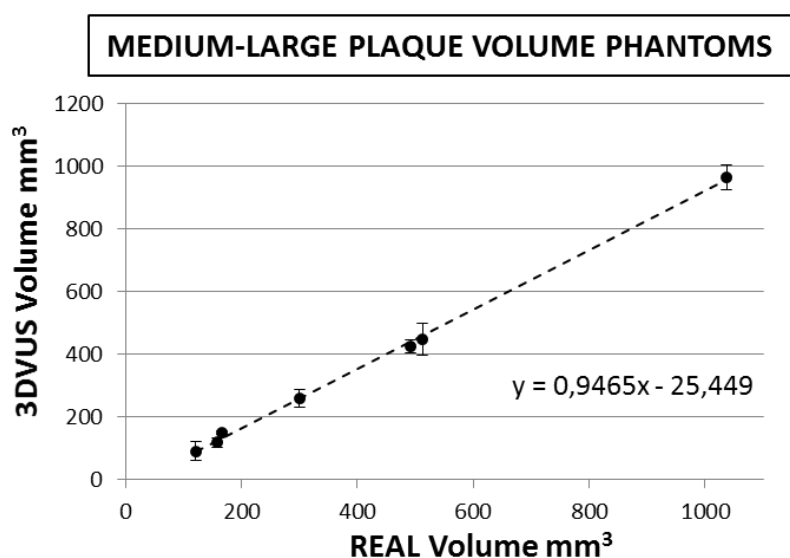


Figura 18 Correlación entre el volumen medido en ecografía 3D y el volumen real en fantasmas de placas moderadas-grandes

Línea de tendencia. Cada medida es la media de 3 observaciones, la desviación estándar de las 3 medidas se muestra con las barras de error.

3DVUS Volume: Volumen medido por el método de ultrasonido vascular 3D. REAL Volume: Volumen real del fantoma

Los gráficos de Bland-Altman confirmaron la buena concordancia entre el volumen real y el medido por el nuevo método de ecografía vascular 3D independientemente del tamaño de la placa, sin observarse desviaciones de las observaciones fuera de los límites de concordancia (Figura 19). Tampoco se observan errores sistemáticos significativos en la medición, aunque sí se puede apreciar una tendencia de la herramienta a sobreestimar ligeramente el volumen medido en las placas de mayor tamaño ($>500 \text{ mm}^3$) (Figura 19B).

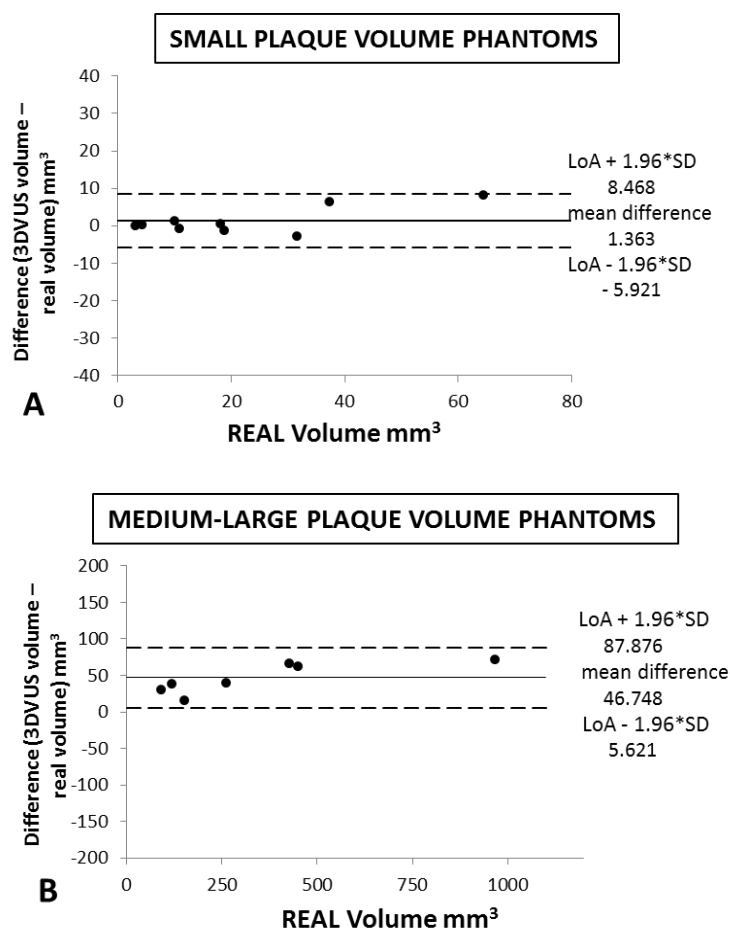


Figura 19 Representación gráfica de la precisión de la medida del volumen con ecografía 3D por el método de Bland-Altman

Gráficas de Bland-Altman en las que se muestra el error medio y los límites de concordancia ± 1.96 SD de las diferencias entre el volumen medido con el método de ecografía vascular 3D y el volumen real del fantoma. En la gráfica A se presentan los resultados del experimento con fantomas que remedan placas pequeñas y en la gráfica B los que remedan placas moderadas-grandes.

Mean difference: error medio. LoA: *limit of agreement* o límite de concordancia. SD: *standard deviation* o desviación estándar.

5.1.3. Influencia de la profundidad del vaso en la precisión de la medida del volumen

El volumen real de los fantomas diseñados para determinar la influencia de la profundidad del vaso escaneado en la precisión de la medida del volumen fue de 26.9 ± 25.3 mm³ (rango 6.5 - 55.2 mm³). El volumen medido con el método de ecografía vascular 3D cuando se localizaban a una profundidad de 3cm fue de 27.9 ± 26.8 mm³ (rango 6.4 - 57.9 mm³), mostrando una excelente correlación con el volumen real, con un ICC de 0.99 y una

correlación r de 0.997 ($p < 0.001$) (Figura 20A). Igualmente, la representación gráfica de la concordancia de los fantasmas superficiales mostró un excelente acuerdo entre las medidas del 3D y las reales (Figura 20C). En cambio, el volumen medido con ecografía 3D cuando se localizaban a una profundidad de 5 cm fue de $47.8 \pm 41.9 \text{ mm}^3$ (rango 11.8 - 93.8 mm^3) mostrando sólo una moderada correlación con el volumen real, con un ICC de 0.67, así como una gran dispersión de las medidas realizadas por los 3 observadores (Figura 20B). En la representación gráfica de Bland-Altman se pone de manifiesto esta amplia dispersión de las diferencias entre el volumen medido y el real, con un error medio elevado de 20.828 mm^3 (Figura 20D).

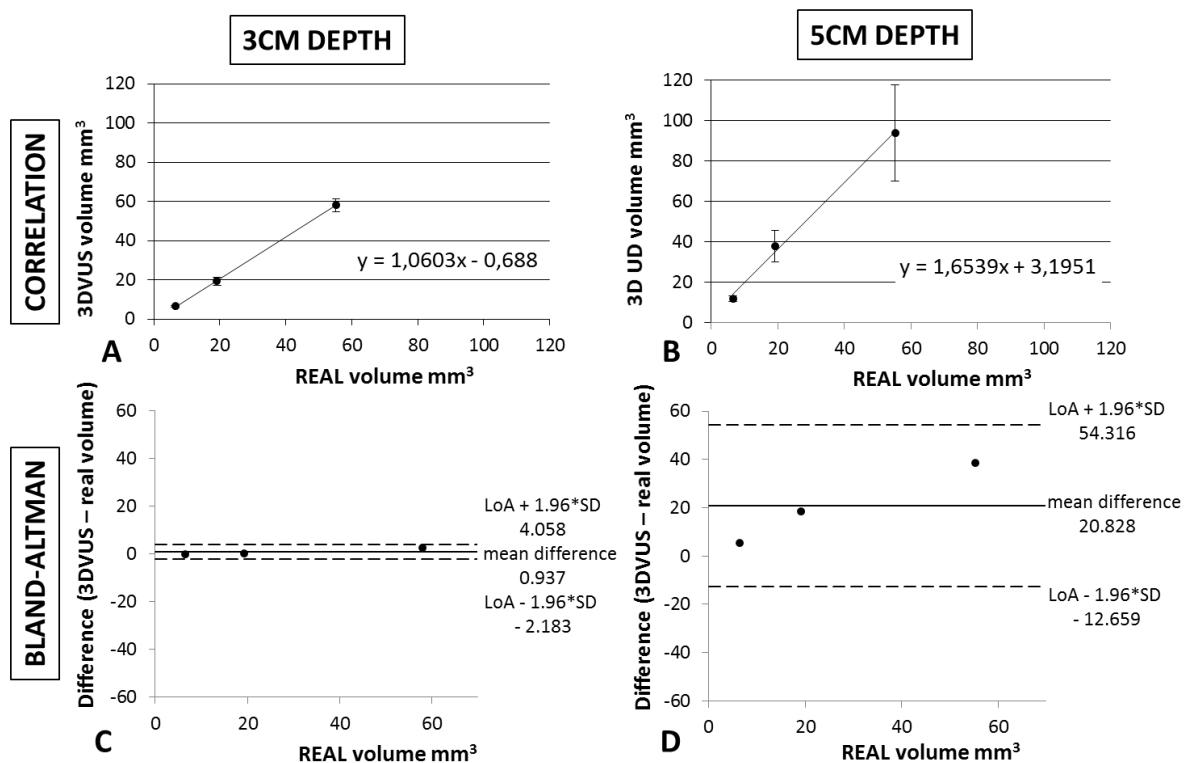


Figura 20 Correlación y representación gráfica de la medida del volumen con ecografía 3D en relación con la profundidad del vaso

A y B muestran las líneas de tendencia. Cada medida es la media de 3 observaciones, la desviación estándar de las 3 medidas se muestra con las barras de error, mostrando una gran dispersión de las medidas del volumen cuando los fantasmas se localizan a 5 cm de profundidad. C y D muestran las diferencias entre el volumen medido y el real e igualmente una pobre concordancia para los fantasmas profundos, mientras que tanto la correlación como la concordancia es excelente en los fantasmas localizados superficialmente a 3cm de profundidad.

3CM DEPTH: 3 centímetros de profundidad. 5CM DEPTH: 5 centímetros de profundidad.

5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN *IN VIVO*

5.2.1. Datos generales del estudio de validación *in vivo*

No hubo mortalidad asociada al procedimiento de la denudación endotelial aórtica. Se registró una mortalidad entre los conejos del 10% que se atribuyó a complicaciones por la dieta rica en colesterol. El tiempo total en dieta de los animales que completaron el protocolo fue de 210 ± 5 días consiguiendo un incremento de sus niveles de lípidos en sangre, determinados al final del protocolo en comparación con su perfil lipídico basal como se observa en la Figura 21.

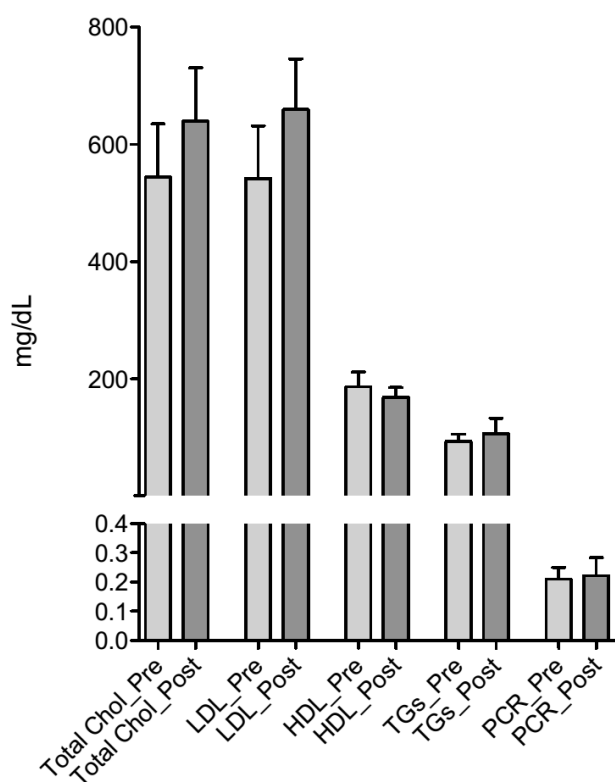


Figura 21 Efectos sobre el perfil sérico lipídico inducido con la dieta rica en colesterol 0.2%

Se objetiva un incremento en los niveles de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos, así como un ligero descenso de los niveles de colesterol HDL. También se aprecia un ligero incremento de los niveles de PCR en sangre, marcador sistémico de inflamación.

Total Chol: colesterol total. TGs: triglicéridos. PCR: proteína C reactiva. Pre: pre-inducción. Post: a la finalización del protocolo. mg/dL: miligramos por decilitro.

Las placas mostraron una composición por histología predominantemente mixta con un core lipídico y una cápsula fibrosa bien definida así como nódulos de calcificación (Figura 22), cumpliendo el objetivo esperado con este modelo de generar placas similares a las de la enfermedad humana en estadios no avanzados, en los que ya se observarían calcificaciones extensas o placas complicadas, con fenómenos trombóticos u obstructivas. En el estudio de

cuantificación del calcio con TAC se confirmó la presencia de un incremento del componente cálcico en las placas inducidas al final del protocolo (Figura 23).

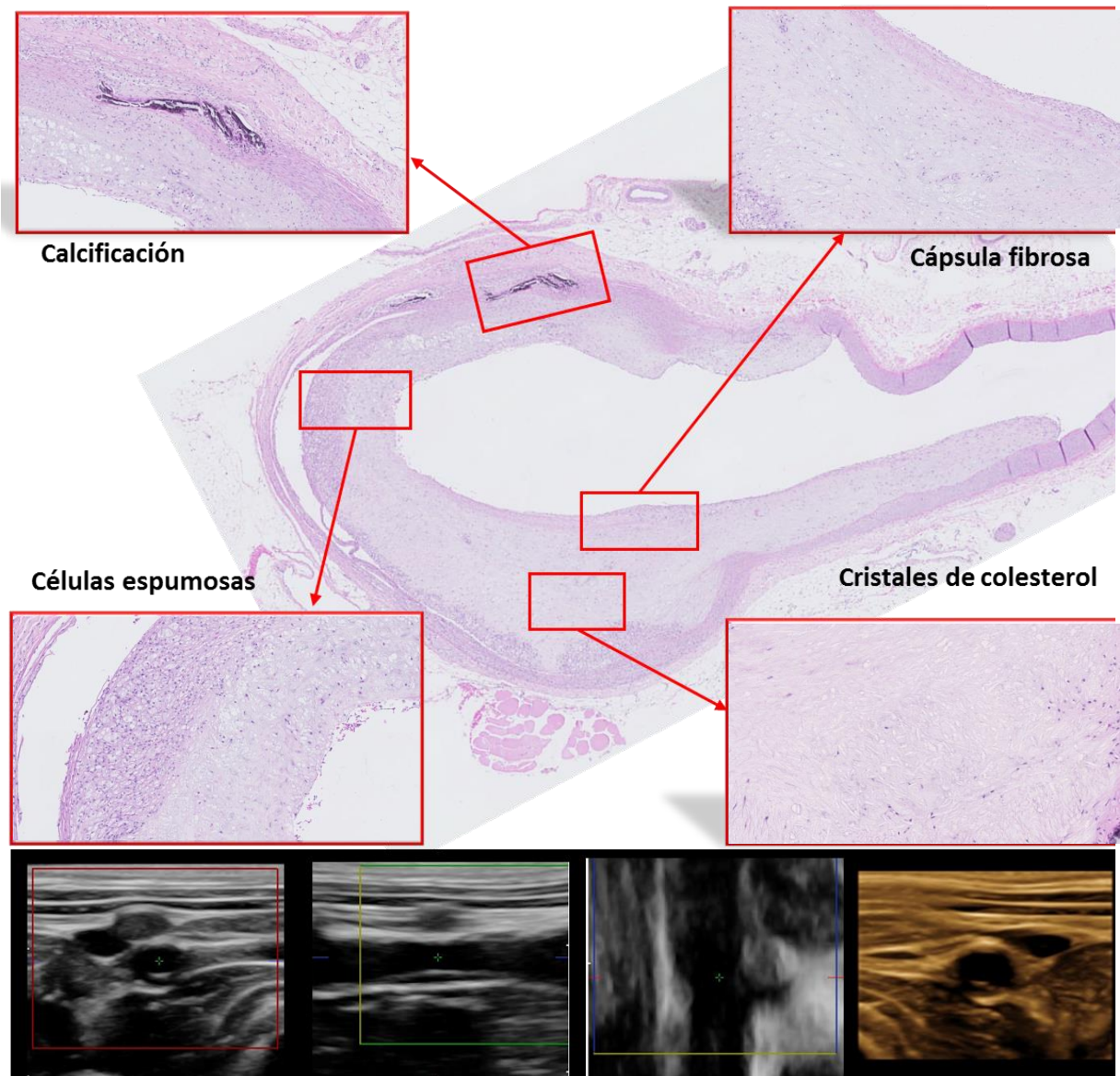


Figura 22 Histología e imagen ecográfica 3D de una placa localizada a nivel del origen de la arteria renal izquierda en el modelo de conejo

Ejemplo de una de las 9 placas incluidas en el experimento *in vivo* seleccionadas por encontrarse en el punto de referencia anatómico establecido del segmento inter-renal para su correcta colocación con la muestra histológica.

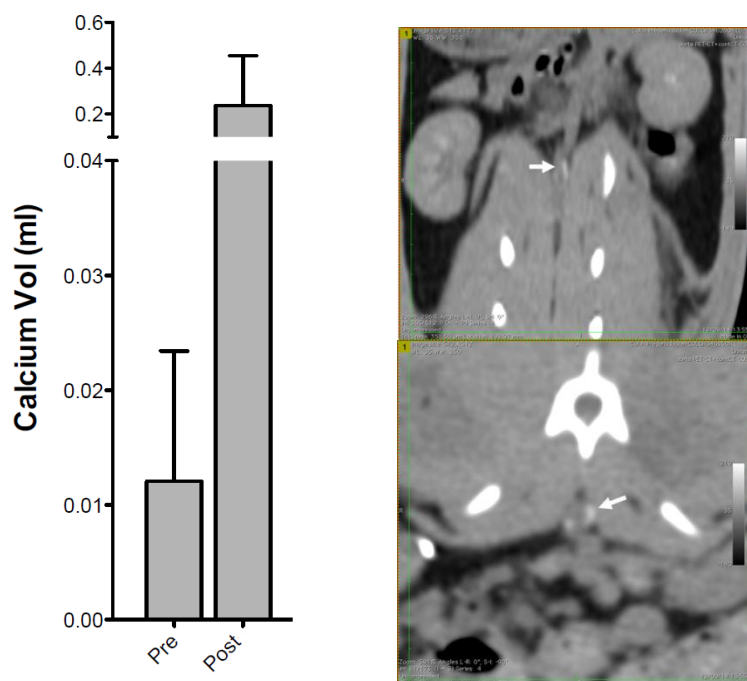


Figura 23 Calcificación en la aorta inducida con el modelo de denudación y dieta rica en colesterol

Se objetiva un incremento del volumen de calcificación en la aorta por la inducción de placas de aterosclerosis.

Pre: pre-inducción. Post: a la finalización del protocolo. Vol ml: volumen en mililitros.

Las condiciones hemodinámicas en las que se realizaron los estudios de ecografía en los animales anestesiados fueron: una frecuencia cardíaca media de 160 ± 14 latidos por minuto, una tensión arterial sistólica media de 96 ± 12 mmHg y una tensión arterial diastólica media de 50 ± 16 mmHg. Las velocidades en el doppler espectral fueron: pico 110 ± 37 cm/s, telediastólica 19 ± 5 cm/s y media 34 ± 15 cm/s. El índice de resistencia medio fue de 0.82 ± 0.06 y el índice de pulsatilidad medio de 2.85 ± 0.9 .

5.2.2. Precisión de la medida del volumen 3D real frente al *gold standard* de la medida del volumen por histología

El volumen medido por histología de las 9 placas identificadas en el segmento interrenal para este experimento fue de 34.2 ± 29.04 mm³ (rango 3.9 - 96 mm³) y su volumen medido con el método de ecografía vascular 3D fue de 33.4 ± 27.99 mm³ (rango 4.02 - 92.5 mm³), mostrando una excelente correlación con el volumen histológico siendo placas todas ellas placas de volúmenes pequeños, con un ICC de 0.99 y una correlación r de 0.998 ($p < 0.001$). La gráfica de Bland-Altman entre el volumen medido con el *gold standard* de la histología y el

medido por el método de ecografía 3D real confirmó un excelente acuerdo entre ambas medidas con una mínima dispersión de las diferencias y sin evidencia de errores sistemáticos (Figura 24).

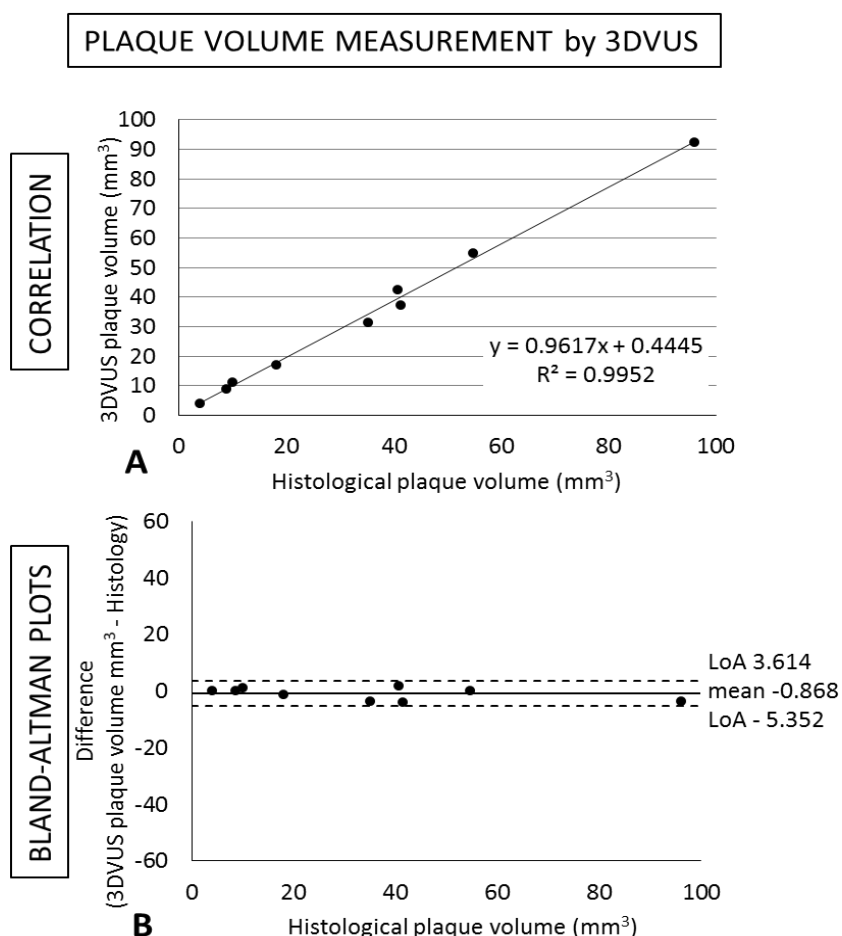


Figura 24 Correlación y gráfica de Bland-Altman de la medida del volumen de placa con ecografía 3D real frente al *gold standard* de la medida del volumen en histología

Se observa una excelente correlación (A) y concordancia libre de errores sistemáticos de la medida (B). 3DVUS: 3D vascular ultrasound o ecografía vascular 3D.

5.2.3. Precisión de la medida de la suma de las áreas de placa o pseudo-volumen frente al *gold standard* de la medida de la suma de las áreas por histología

La suma de las áreas de placa o pseudo-volumen medido por histología de las 9 placas fue de $124 \pm 95.5 \text{ mm}^2$ (rango 19.1 – 316 mm²) y la suma de las áreas de placa medida con el método del barrido manual 2D/pseudo-3D fue de $203.2 \pm 158.1 \text{ mm}^2$ (rango 49 – 520 mm²). Estos resultados mostraron una menor correlación del método de medida con el método tradicional 2D/pseudo-3D frente al *gold standard* histológico, con un ICC de 0.86.

SUM OF PLAQUE AREAS MEASUREMENT by 2D/3D-LIKE FREEHAND US

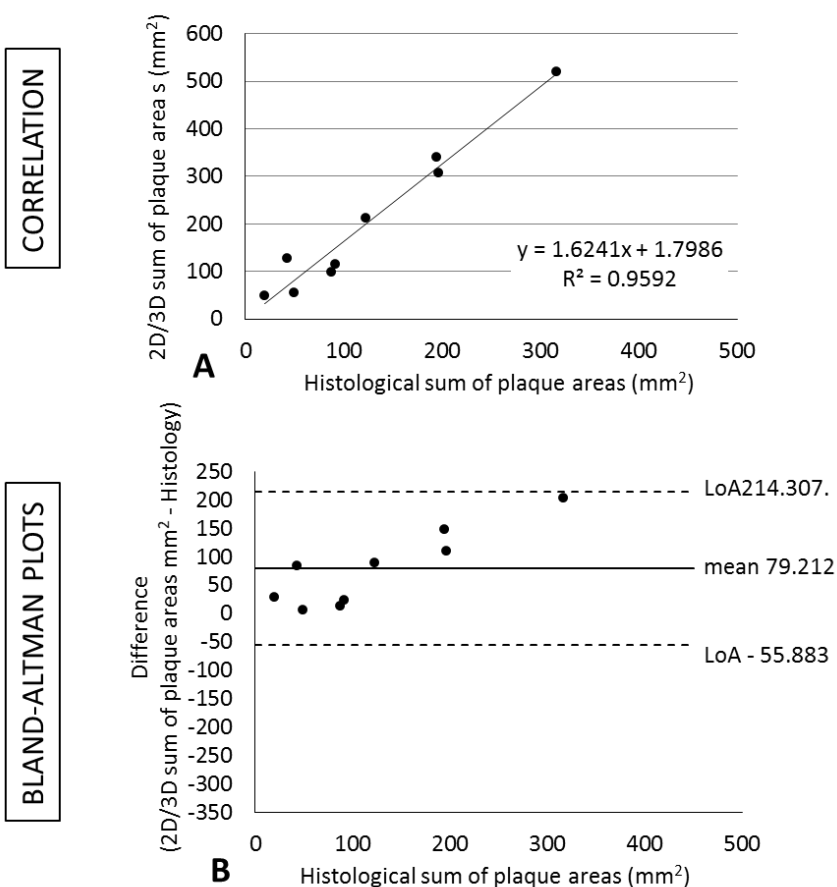


Figura 25 Correlación y gráfica de Bland-Altman de la medida de la suma de las áreas de la placa con el barrido manual 2D/pseudo-3D frente al *gold standard* de la suma de las áreas medida en histología

Se observa una muestra que muestra una peor correlación (A) con una importante dispersión de las medidas y una tendencia a sobreestimar la suma de las áreas a mayor tamaño de la placa (B).

2D/PSEUDO-3D FREEHAND US Sum of plaque areas: Suma de las áreas de placa medida por el método del barrido manual 2D/pseudo-3D.

La gráfica de Bland-Altman entre la suma de las áreas de placa medido con el *gold standard* de la histología y el medido por el 2D/pseudo-3D confirmó esta menor concordancia y mostró una gran dispersión de las diferencias entre ambas medidas con un error medio muy elevado de 79.212 mm² y unos límites de concordancia entre -55.883 y 214.307 mm². Además, puso en evidencia un error sistemático en la medida 2D/pseudo-3D que tiende a sobreestimar las áreas a mayor tamaño de las placas (Figura 25).

5.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN CLÍNICA EN UN GRUPO DE PARTICIPANTES DE MEDIANA EDAD LIBRES DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

5.3.1. Datos generales del estudio de validación clínica

Las características demográficas y epidemiológicas basales del subgrupo de sujetos incluidos en el estudio de validación clínica de la ecografía vascular 3D real fueron representativas de las características generales de la cohorte basal del estudio PESA (Tabla 2).

	Muestra del PESA (n=32)	PESA Cohorte total (n=4066)	p valor
Características Basales			
Edad (años)	47,3 ± 4,4	45.8 ± 4.3	n.s.
Mujer	8 (25)	1493 (36)	
Índice de masa corporal (Kg/ m ²)	27 ± 3,5	26.2 ± 3.8	n.s.
Presión arterial sistólica (mmHg)	119 ± 14,1	116 ± 12.5	n.s.
Presión arterial diastólica (mmHg)	73,8 ± 10,1	72.5 ± 9.4	n.s.
Colesterol total (mg/dL)	207 ± 33,1	201 ± 33.3	n.s.
Colesterol LDL (mg/dL)	137 ± 29,1	132 ± 29.8	n.s.
Colesterol HDL (mg/dL)	47,2 ± 9,7	49 ± 12.2	n.s.
Triglicéridos (mg/dL)	112 ± 59	95 ± 57.2	n.s.
Glucemia basal (mg/dL)	96,8 ± 25,3	90.6 ± 13.8	n.s.
Hemoglobina A1c (%)	5,62 ± 0,7	5.44 ± 0.5	n.s.

Tabla 2 Características demográficas y epidemiológicas de los participantes del estudio PESA
n.s.: estadísticamente no significativo

5.3.2. Viabilidad del protocolo de estudio de la aterosclerosis precoz con ecografía vascular 3D real y su comparación con el método tradicional del barrido manual 2D

Todos los 128 territorios (32 estudios de participantes PESA) pudieron ser analizados satisfactoriamente tanto en ecografía 3D como en 2D. Se describió la presencia de buena ventana ecográfica en 113 (88%) de los estudios 3D y en 120 (93%) de los estudios 2D. La presencia de una mala ventana ecográfica fue más frecuente en el territorio femoral que en el

carotideo para las 2 técnicas, 15.7% vs 7.8% en los estudios 3D y 11.7% vs 9.3% en los estudios 2D, no apreciándose diferencias significativas en la viabilidad de ambos métodos para la exploración de la aterosclerosis precoz en carótidas y femorales.

El método de análisis semiautomático de las adquisiciones 3D consiguió discriminar y delinear adecuadamente el 63% de las placas de aterosclerosis de entre los 69 territorios en los que se visualizó la presencia de enfermedad. Este análisis semiautomático tuvo que ser revisado y corregido manualmente con mayor frecuencia en las adquisiciones femorales. Diecinueve de 38 (50%) de los análisis semiautomáticos en femorales necesitaron corrección manual, mientras que en las carótidas, la herramienta de análisis semiautomático 3D discriminó y delineó adecuadamente un alto porcentaje de las placas, necesitando sólo 6 de 31 (19%) edición manual. La causa más frecuente de fallo del análisis semiautomático y la necesidad de corregir manualmente la delimitación de la transición luz-placa fue la elevada presencia de placas hipocogénicas o “blandas”, y la segunda causa más frecuente, muy alejada del elevado porcentaje de fallo por placas blandas, fue la presencia de morfologías complejas. La presencia de otras características como calcificaciones severas o sombras posteriores por la presencia de calcio, no se dio en ninguno de nuestros participantes, lo cual cabía de esperar dado el bajo perfil de riesgo y etapas tempranas de aterosclerosis de la cohorte. El análisis de la viabilidad del protocolo 3D y 2D se resumen en la Tabla 3.

Eco 2D **Eco Vascular 3D Real**

	Eco 2D		Eco Vascular 3D Real	
	Total	Carotidas	Femorales	Total
Número de territorios analizados	128	64	64	128
Número de territorios con aterosclerosis	73 (57%)	32 (44%)	41(56%)	69 (53%)
Calidad de la imagen ecográfica 3D				
Óptima	120 (93.7%)	62 (96.8%)	58 (90.6%)	113 (88.2%)
Mala ventana ecográfica	8 (6.3%)	2 (3.2%)	6 (9.3%)	15 (11.7%)
Adquisición no válida para el análisis	0	0	0	0

Eco Vascular 3D Real

	Eco Vascular 3D Real	
	Carotidas	Femorales
Fallo de la herramienta de análisis de placa semiautomático	25 (36.2%)	6 (24%)
Fallo por ser placas hipocogénicas	24 (96%)	5 (83%)
Fallo por ser placas de morfología compleja	5 (20%)	1 (17%)
Fallo por la presencia de sobras posteriores por calcio	0	0
Volumen global de aterosclerosis medido por los 3 observadores		
Observador 1	56.9 ± 59mm ³	33.2 ± 33mm ³
Observador 2	58.5 ± 50mm ³	34.0 ± 31mm ³
Observador 3	59.7 ± 54mm ³	37.9 ± 37mm ³

Tabla 3 Viabilidad del protocolo para el estudio de la aterosclerosis precoz con el nuevo método de ecografía vascular 3D real y del método tradicional del barrido manual por ecografía 2D

5.3.3. Fiabilidad en la detección de la aterosclerosis precoz de la ecografía vascular 3D real y su comparación con el método tradicional 2D

Sesenta y nueve de los 128 territorios seleccionados presentaron enfermedad aterosclerótica por ecografía vascular 3D real, 45% de las carótidas y 55% de las femorales. El análisis de ecografía vascular 2D detectó enfermedad en 4 territorios más que el análisis 3D (Tabla 3). El coeficiente de concordancia *Kappa* para la detección de enfermedad entre ambas técnicas fue muy alto, de 0.89 (*Kappa* de 0.93 para la detección en las carótidas y *Kappa* de 0.83 para la detección en las femorales).

Tres de las 4 placas que detectó el método 2D por encima de las detectadas con 3D se localizaron en el territorio femoral. Éstas se situaban alejadas de la bifurcación, por lo que el eco 3D no pudo visualizarlas al no quedar incluidas dentro del campo de visión de la adquisición estandarizada de 6 cm de longitud (30 grados) centrada en la bifurcación. La cuarta placa que detectó el 2D sobre el 3D se localizó en el bulbo carotideo. Ésta era una placa hipocogénica y la adquisición 3D se había calificado como de pobre ventana ecográfica presentando además artefactos de movimiento que dificultaban su interpretación.

5.3.4. Consistencia en la detección de la aterosclerosis precoz de la ecografía vascular 3D real y su comparación con el método tradicional 2D

5.4.3.1. Concordancia inter-observador

La concordancia inter-observador para la detección de la presencia de placas de aterosclerosis con el método de ecografía 3D fue muy buena, índice *Kappa* entre 0.84 y 0.97 (Tabla 4). Mientras que la concordancia inter-observador con el método 2D fue también buena aunque ligeramente más variable con índices *Kappa* entre 0.70 y 1.

Kappa inter-observador para la detección de placa por ecografía vascular 3D real						
N=69	Todos los territorios		Carótidas		Femorales	
	Observador 2	Observador 3	Observador 2	Observador 3	Observador 2	Observador 3
Observador 1	0,95	0,89	0,94	0,84	0,97	0,93
Observador 2		0,87		0,84		0,90

Kappa intra-observador para la detección de placa por ecografía vascular 3D real			
N=69	Todos los territorios	Carótidas	Femorales
Observador 1	1	1	1
Observador 2	1	1	1
Observador 3	0,95	0,94	0,97

Tabla 4 Consistencia de la detección de aterosclerosis por ecografía vascular 3D real en el subgrupo de participantes del estudio PESA

5.4.3.2. Concordancia intra-observador

La concordancia intra-observador para la detección de la presencia de placas de aterosclerosis con el método de ecografía 3D fue excelente, índices *kappa* entre 0.94 y 1 (Tabla 4). Mientras que la concordancia intra-observador con el método 2D fue moderada con índices *Kappa* entre 0.45 y 0.71.

5.3.5. Reproducibilidad de la medida del volumen de aterosclerosis medido por el nuevo método de ecografía 3D real

5.3.5.1. Datos generales de la reproducibilidad del volumen de aterosclerosis

La carga de aterosclerosis o volumen global de placa entre los participantes con enfermedad en algún territorio fue variable, con volúmenes de placa pequeños, desde 3.6 mm³, hasta volúmenes de placa moderados, de 242.7 mm³. Analizando los territorios por separado, la carga de aterosclerosis media fue mayor en las femorales que en las carótidas, 75.3 ± 60 mm³ y 35.0 ± 33 mm³ respectivamente.

5.3.5.2. *Reproducibilidad intra-observador e inter-observador del volumen de aterosclerosis global*

La reproducibilidad intra e inter-observador de la medida del volumen de placa global con ecografía vascular 3D real fue muy buena, con valores de ICC entre 0.91 y 0.97 (Tabla 5). La gráfica de Bland-Altman entre los volúmenes medidos por los 3 observadores comparados 2 a 2 confirmó un excelente acuerdo entre las medidas con una mínima dispersión de las diferencias, obteniendo unos límites de concordancia estrechos y sin evidencia de errores sistemáticos significativos, es decir, menos del 5% de las diferencias se localizaron por fuera de los límites de concordancia (Figura 26A y B).

ICC inter-observador de la medida del volumen de aterosclerosis						
Todos los territorios			Carotidas		Femorales	
N=69	Observador 2	Observador 3	Observador2	Observador 3	Observador 2	Observador 3
Observador 1	0,81 (0,70-0,88)	0,85 (0,77-0,91)	0,89 (0,76-0,95)	0,80 (0,58-0,91)	0,77 (0,59-0,87)	0,83 (0,70-0,91)
Observador 2		0,86 (0,77-0,91)		0,76 (0,54-0,88)		0,85 (0,93-0,92)
Global	0,89 (0,86-0,91)		0,81 (0,67-0,91)		0,82 (0,71-0,89)	
ICC intra-observador de la medida del volumen de aterosclerosis						
N=69	Todos los territorios		Carotidas		Femorales	
Observador 1	0,97 (0,94-0,98)		0,90 (0,77-0,95)		0,97 (0,95-0,99)	
Observador 2	0,96 (0,94-0,98)		0,96 (0,91-0,98)		0,95 (0,91-0,97)	
Observador 3	0,88 (0,81-0,93)		0,88 (0,76-0,94)		0,85 (0,73-0,92)	
Global	0,87 (0,83-0,90)		0,91 (0,86-0,94)		0,93 (0,90-0,95)	

Tabla 5 Reproducibilidad de la medida del volumen de aterosclerosis por ecografía vascular 3D real en el subgrupo de participantes del estudio PESA

Aun no siendo significativo, se puede apreciar un incremento absoluto de las diferencias entre las medidas de los observadores a mayor tamaño de las placas o error proporcional a la media. Éste efecto también se observaba en los estudios que analizaron la variabilidad de la medida del volumen previamente y tiene que ver con que la representación de Bland-Altman se hace con valores de cambio absolutos, por lo que a mayor tamaño de placa, proporcionalmente, una mínima variación en la medida es mayor que en una placa pequeña en términos absolutos. En nuestra muestra, este efecto es aún más marcado debido a la gran dispersión en tamaños entre las placas observadas.

Para compensar este efecto de proporcionalidad por la gran diferencia entre los tamaños de las placas de la muestra, se repitieron las gráficas de Bland-Altman esta vez con los volúmenes transformados logarítmicamente, homogeneizando en una distribución más normalizada, los tamaños de las placas. Éstas mostraron una distribución homogénea de las diferencias sin observarse error proporcional a la media (Figura 26C y D).

5.3.5.3. Reproducibilidad de la medida del volumen en los territorios carotideo y femoral por separado

Se analizó por separado la reproducibilidad de la medida del volumen de aterosclerosis en las carótidas y en las femorales. La concordancia intra e inter-observador fue igualmente buena para ambos territorios, con ICC superiores a 0.8 (Tabla 5). Las gráficas de Bland-Altman confirmaron esta buena concordancia independientemente del territorio explorado (Figura 27A y B). Igualmente se repitieron las gráficas con los volúmenes transformados logarítmicamente para normalizar la distribución de los tamaños de las placas y amortiguar la gran dispersión de los tamaños de placa de la muestra. Éstas de nuevo mostraron una distribución homogénea sin errores sistemáticos (Figura 27C y D).

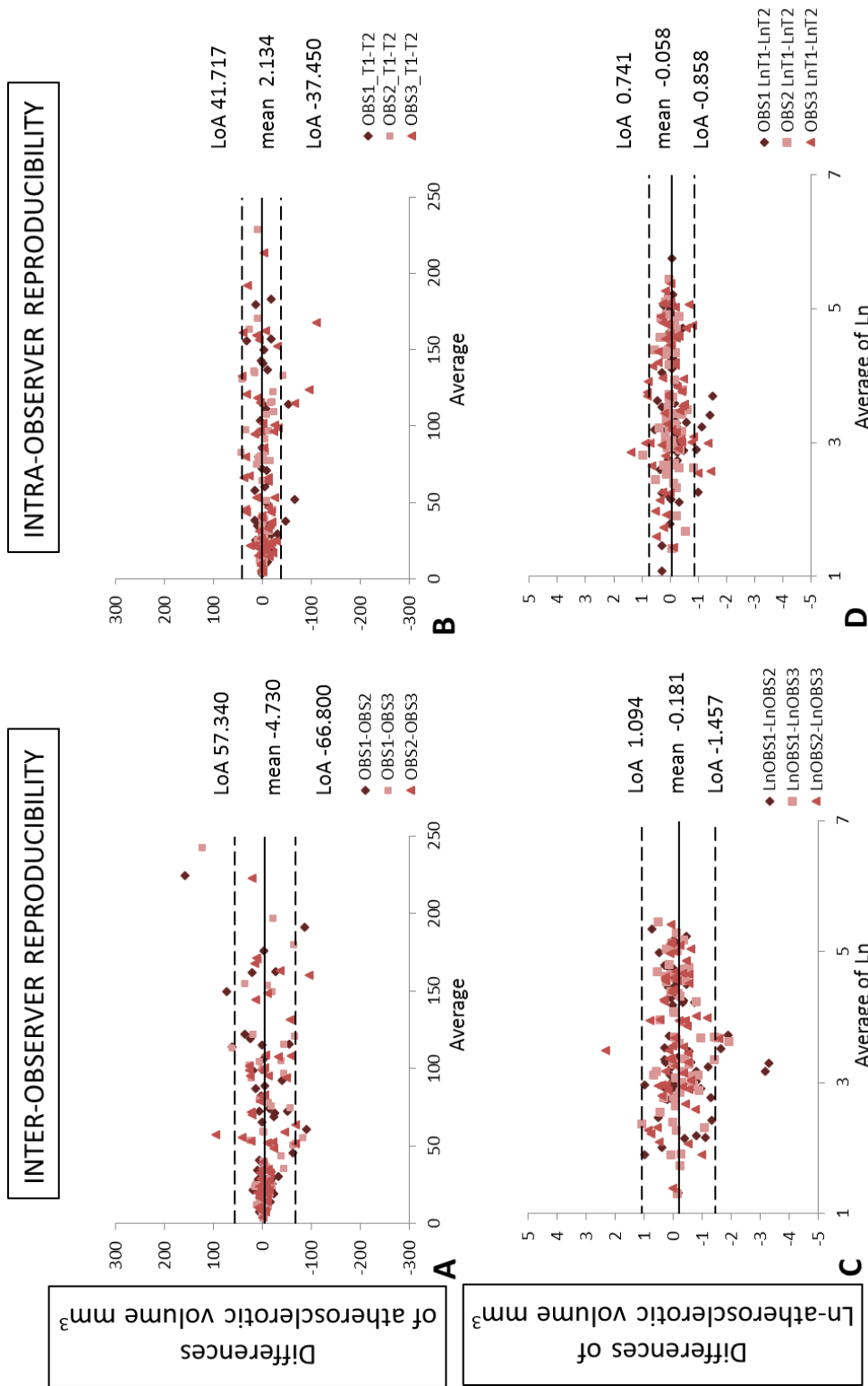


Figura 26 Gráficas de Bland-Altman de la medida del volumen por ecografía vascular 3D real en el subgrupo del estudio PESA

A y B muestran la distribución de las diferencias entre las medidas de los 3 observadores comparadas 2 a 2 frente al volumen medio de placa calculado como la media entre las 3 observaciones. Se observa un incremento de las diferencias a mayor tamaño de la placa sin ser significativo. C y D muestran las diferencias para el valor del volumen transformado logarítmicamente siguiendo una distribución homogénea.

LoA: *limit of agreement* o límite de concordancia. OBS1-OBS2: diferencia entre el valor medido por el observador 1 y el 2; OBS1T1-T2: diferencia entre el valor medido en el tiempo 1 y en el tiempo 2 por el observador 1; LnOBS: valores medidos por los observadores transformados logarítmicamente.

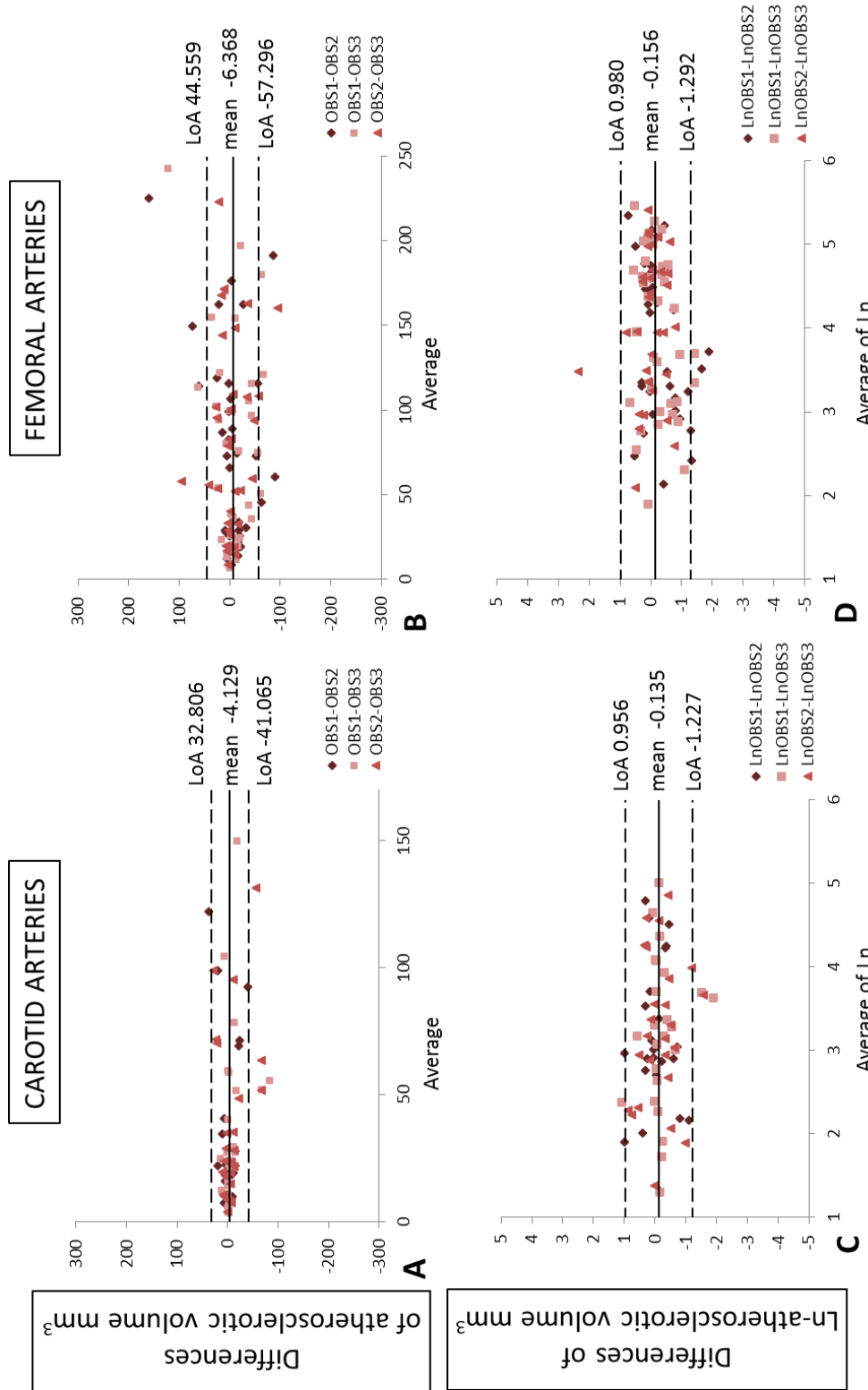


Figura 27 Gráficas de Bland-Altman de la medida del volumen por ecografía vascular 3D real en carótidas y femorales por separado

A y B muestran las gráficas de Bland-Altman de las diferencias entre las medida de los 3 observadores comparadas 2 a 2 frente al volumen medio de placa calculado como la media entre las 3 observaciones. C y D muestran las mismas gráficas para el valor del volumen transformado logarítmicamente. LoA: *limit of agreement* o límite de concordancia. OBS1-OBS2: diferencia entre el valor medido por el observador 1 y el 2; OBS1-T2: diferencia entre el valor medido en el tiempo 1 y en el tiempo 2 por el observador 1; LnOBS: valores medidos por los observadores transformados logarítmicamente.

6. DISCUSIÓN

La detección y la cuantificación de la aterosclerosis subclínica por técnicas de imagen no invasiva es un marcador cada vez más usado en la evaluación y re-estratificación del riesgo CV (15, 16). Entre todas las modalidades de imagen, el score de calcio coronario por TAC (37, 89) y la cuantificación de la carga de aterosclerosis por ecografía (98, 101) han demostrado mejorar la valoración del riesgo CV individual por encima de las escalas de riesgo convencionales basadas en la presencia de factores de riesgo tradicionales. La cuantificación de la carga de aterosclerosis para la evaluación del riesgo CV requiere por tanto una herramienta sobretodo precisa, ya que el riesgo aumenta de una manera proporcional a la carga de enfermedad subclínica, que mida el volumen de placa, como medida que integra los tres aspectos de la presencia, la severidad y la extensión de la enfermedad, de una manera sencilla y reproducible para poder extender su uso a la población general.

El método de ecografía vascular 3D real es un método que ha demostrado ser más reproducible en la medida del volumen de aterosclerosis frente a los métodos anteriores como el barrido manual 2D/pseudo-3D (30, 111), sin embargo su precisión en la medición del volumen nunca había sido estudiada. Además, el método de ecografía vascular 3D real sólo ha sido utilizado hasta ahora en muy pocos estudios que se han centrado en la valoración de la aterosclerosis avanzada a nivel del territorio carotideo con diferentes metodologías (98, 101, 109). Nunca se ha propuesto un protocolo estandarizado de valoración de la aterosclerosis con ecografía vascular 3D real, tampoco existe evidencia que apoye su uso en otros contextos clínicos como la aterosclerosis precoz, un estadio en el que aplicar estrategias de prevención alcanzaría un mayor interés, o su aplicación a otros territorios vasculares a parte de las carótidas.

En este trabajo de tesis doctoral hemos demostrado que la ecografía vascular 3D real que utiliza la nueva sonda lineal-volumétrica y el software de análisis 3D real cuantifica de una manera precisa el volumen de aterosclerosis independientemente del tamaño de las placas.

Resaltar que consigue una precisión excelente en la cuantificación de las placas pequeñas, las que encontramos en los estadios precoces de la enfermedad aterosclerótica. También hemos demostrado que cuantifica de una manera precisa el volumen de aterosclerosis localizada en arterias superficiales, mientras que su precisión en la evaluación de territorios profundos, por debajo de 5 cm de profundidad, es limitada, proponiendo esta técnica como válida para el estudio de territorios como las carótidas o las femorales, y no así para otros territorios profundos como las iliacas o la aorta abdominal.

Además, en el presente estudio, proponemos un protocolo clínico estandarizado para la evaluación de la aterosclerosis subclínica en los territorios carotideo y femoral que se ha demostrado viable, fiable, consistente y reproducible en la detección y la cuantificación de la enfermedad aterosclerótica precoz, con resultados similares a la detección de enfermedad por el método del barrido manual 2D, y con unos resultados que mejoran la cuantificación del volumen de aterosclerosis con respecto a lo publicado previamente.

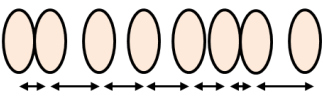
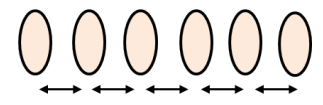
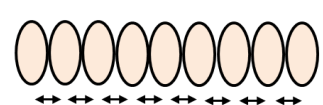
6.1. PRECISIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DEL VOLUMEN EN EL EXPERIMENTO *IN VITRO*

Estudios anteriores habían evaluado la precisión de la medida del volumen con ecografía vascular 3D real pero únicamente utilizando fantomas que remedaban placas de intermedio-gran tamaño, de entre 100 y 1.500 mm³ (30, 109). Nuestro estudio es el primero en evaluar de una manera extensa, con la mayor colección de fantomas diseñados, la precisión del nuevo método para la cuantificación de un amplio rango de volúmenes, con especial foco en las placas pequeñas, de entre 3 y 65 mm³, donde a diferencia de los métodos antiguos, hemos probado una excelente precisión de la herramienta 3D real. Además hemos confirmado la buena precisión que también tiene la herramienta para cuantificar los volúmenes intermedios y grandes utilizando fantomas de entre 91 y 965 mm³.

Un factor determinante de la precisión en la medida del volumen 3D se ha visto que es el movimiento con el que se desplaza el haz de ultrasonidos a lo largo del eje longitudinal de la arteria constituyendo el eje z o lateral de la imagen 3D, el cual determina la distancia entre *frames* y por tanto la resolución de la imagen en su reconstrucción volumétrica (104). Hasta ahora, han sido 3 los métodos de ecografía en 3D que se han desarrollado para la imagen vascular (Figura 28). Su desarrollo ha obedecido fundamentalmente a la necesidad de mejorar la resolución para mejorar la precisión del análisis del volumen de placa. El primer método, y más ampliamente extendido en clínica, ha sido el barrido manual 2D/pseudo-3D en el que una sonda 2D convencional es trasladada manualmente por un ecografista a lo largo de la arteria, obteniendo por tanto, un barrido de imágenes consecutivas o *frames* con una distancia entre *frames* variable. Para solventar este problema y conseguir una distancia entre *frames* constante que permita calcular el volumen de placa, surgieron los métodos 3D con guía mecánica externa, en los que un brazo mecánico controla el desplazamiento de una sonda 2D convencional y así consigue una velocidad de barrido constante. La resolución conseguida por este método no ha sido del todo óptima, adquiriendo imágenes con una distancia entre *frames* de entre 0.5 y 5 mm según el dispositivo. Estos métodos 3D de guía externa no han conseguido consolidarse en la clínica por varios motivos, además de que la preparación y el ajuste del brazo mecánico al paciente es farragoso, no existen dispositivos comercializados, y al valerse de un desplazamiento de la sonda con un brazo dirigido por la piel del paciente, se han descrito artefactos en la imagen por mal contacto y movimiento (97).

Aunque no existen estudios que evalúen directamente la precisión de la medida del volumen por estos métodos, sí se ha evaluado su reproducibilidad como variable subrogada de la precisión (125). Se ha demostrado que la reproducibilidad de la medida del volumen mejora cuando la velocidad del barrido es constante (126, 127), es decir, el barrido manual 2D/3pseudo-D ha demostrado ser la técnica más variable en la cuantificación de la placa (30),

y que la reproducibilidad mejora de manera significativa a menor distancia entre *frames*, como describe Landry et al (106) utilizando el método 3D con guía mecánica externa, en el que resoluciones mayores de 3 mm de distancia entre *frames* con llevaban una variabilidad significativa en las mediciones. De manera que, una distancia entre *frames* indeterminada o demasiado separada va a derivar en una pobre resolución de las placas, sobre todo cuando son de pequeño tamaño, estableciéndose incluso un límite de tamaño de entorno a los 70 mm³ por encima del cual se podría cuantificar el volumen de placa con la suficiente fiabilidad si se utilizaba la adquisición 2D/pseudo-3D o una sonda 2D con guía mecánica externa (104, 105, 107). Es por todo ello que estos métodos quedaron invalidados para cualquier estrategia que implicara la detección y cuantificación de placas de aterosclerosis en sus estadios precoces.

		<i>FRAMES</i> ADQUIRIDOS (Esquema)	DISTANCIA ENTRE <i>FRAMES</i> (Resolución)	UNIDAD	LIMITACIONES
MÉTODOS MANUALES	2D/PSEUDO- 3D		Variable y Desconocida	Suma de áreas (mm ²)	No da volumen Pobre reproducibilidad intra- y entre-observador
	3D GUIA EXTERNA		Constante 0.5 to 5 mm	Volumen (mm ³)	Pobre precisión en la detección y cuantificación de placas pequeñas.
MÉTODOS MECÁNICOS	3D REAL		Constante 0.1 to 0.3 mm	Volumen (mm ³)	Para cualquier tamaño de placa. Para placas superficiales (<5cm de profundidad).

↔ Distancia entre *frames* ○ Imágenes consecutivas axiales de la arteria

Figura 28 Esquema de los métodos de ecografía vascular 3D

La posibilidad de cuantificar de una manera precisa la carga de aterosclerosis leve o de placas de pequeño tamaño, es de gran valor para los estudios que buscan estrategias de prevención CV en población joven, donde la enfermedad aterosclerótica se encuentra en sus estadios incipientes. Este es el caso del estudio PESA llevado a cabo por nuestro grupo, en el que en algo más de 4.000 individuos de entre 40 y 55 años sin antecedentes de enfermedad CV, está siendo estudiada la presencia y la carga o volumen de aterosclerosis en los territorios

femoral y carotideo por ecografía vascular 3D real. El objetivo principal es establecer los factores determinantes de la aparición y progresión de la aterosclerosis a lo largo de 9 años de seguimiento, e incluso llegar a determinar su valor en la predicción del riesgo de desarrollar enfermedad o eventos cardiovasculares (94). Los datos recientemente publicados de la cohorte basal del PESA han destapado una prevalencia inesperadamente alta de enfermedad aterosclerótica en población joven y *a priori* sana, con cerca del 62.5% de los participantes afectados por la presencia de placas en al menos un territorio de los explorados entre los que se incluían las arterias carótidas, la aorta abdominal, el territorio iliaco-femoral y la presencia de calcio coronario (Figura 29) (95). El siguiente paso, tras la validación del método de ecografía vascular 3D real, será el análisis de la carga o volumen de aterosclerosis subclínica precoz en la cohorte PESA, en las arterias periféricas superficiales como las arterias carótidas y femorales, y así establecer su asociación con los factores de riesgo, los determinantes de su progresión o regresión a lo largo del tiempo y su capacidad de predecir el desarrollo de la enfermedad CV.

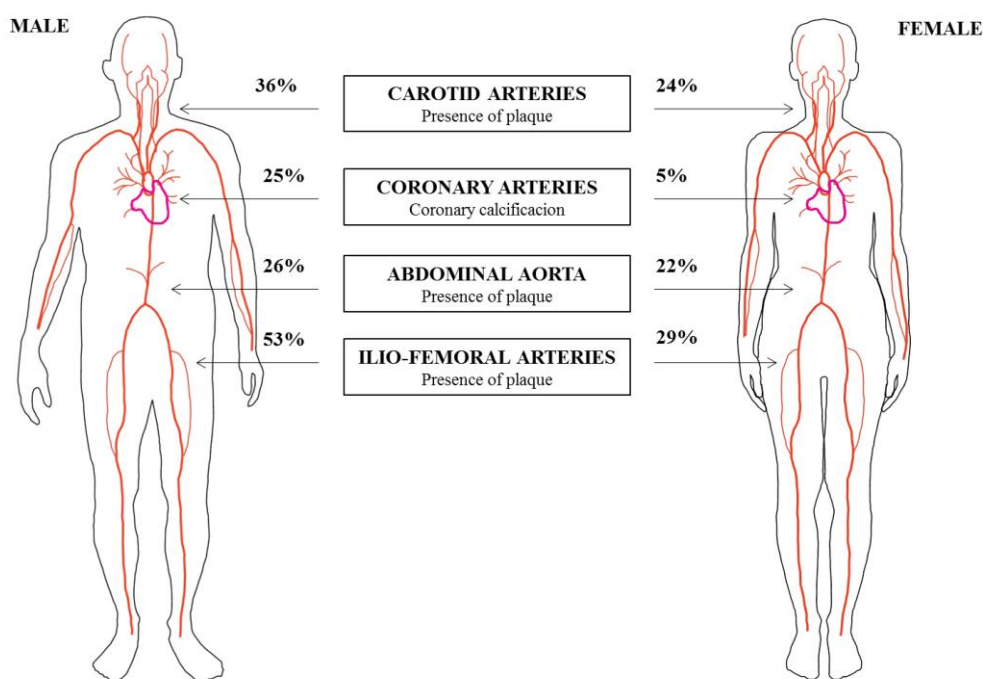


Figura 29 Prevalencia de enfermedad aterosclerótica subclínica sistémica en la población del estudio PESA

Respecto al método de la ecografía vascular 3D real basado en la nueva sonda lineal-volumétrica, se podría clasificar como un método de los considerados “mecánicos”. Su diferencia fundamental es que la guía del haz de ultrasonidos es interna, quedando alojada en el interior de la sonda y consiguiendo así una mayor densidad de líneas en su barrido con un menor desplazamiento. Su huella es cuadrada y permite fijar la sonda en una posición que quede centrada con respecto a la estructura que se desea escanear, garantizando un buen contacto con la piel y un mejor control de posibles artefactos de movimiento durante la adquisición al no tener que desplazarla. La adquisición se programa determinando la distancia angular que se desea abarcar, que puede ser de entre 10 y 30 grados, lo que equivale a una distancia del segmento escaneado de entre 3 y 6 cm de longitud o eje z (Figura 30).

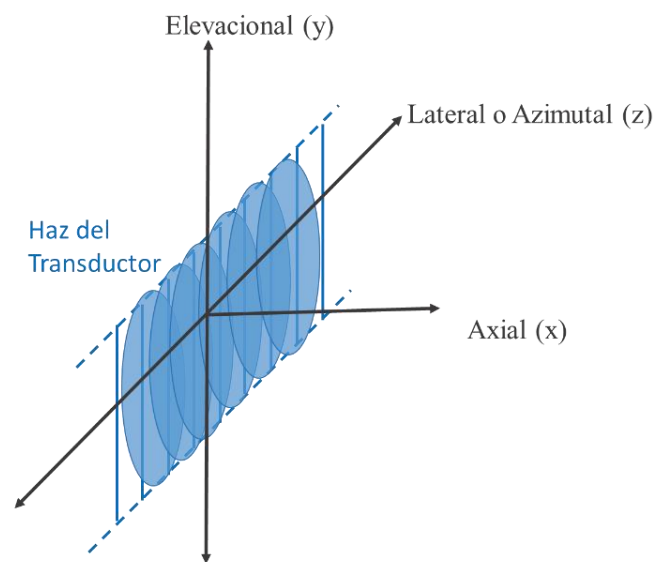


Figura 30 Esquema de los 3 ejes del espacio de la imagen volumétrica

La resolución teórica de la imagen volumétrica adquirida se resume en la Tabla 6 (128), y se obtiene gracias a conseguir una distancia entre *frames* de entre 0.1 y 0.3 mm según si la distancia angular se programa más o menos abierta, y por tanto, con mayor o menor densidad de líneas por mm, mejorando en cualquier caso la resolución conseguida por los métodos 3D previos.

Profundidad, cm	Axial o eje x, mm	Azimutal o eje z, mm	Elevacional o eje y, mm
2	0.5	0.5	1
4	0.65	1	1.70
6	0.65	1.30	2.40

Tabla 6 Resolución teórica de la sonda VL13-5

Valores de resolución en los 3 ejes del espacio de la Sonda lineal volumétrica VL13-5 (Philips Healthcare, Andover, MA, USA) (128)

En la Tabla 6 queda patente que existe una marcada degradación o pérdida de resolución de la imagen volumétrica en el eje elevacional, o eje y, con la profundidad. La resolución en este eje del volumen está relacionada sobre todo con la distancia entre *frames* y por tanto contribuiría en cualquier imprecisión a la hora de detectar o de cuantificar volúmenes pequeños, que como hemos visto, está íntimamente relacionada con el grosor entre fotogramas que se consigue. Se postula que este deterioro de la resolución en el eje y de la imagen volumétrica es debido a que el barrido interno del haz de ultrasonidos hace un movimiento “en abanico” para su adquisición, de manera que a mayor incremento de la profundidad más se separan las líneas de ultrasonidos, con ello se incrementa la distancia entre *frames*, y el resultado es una disminución en la resolución en este plano, y algo menor pero también valorable en el plano z (108). Es por esta potencial limitación por la que se propuso el experimento para determinar cómo afectaba la profundidad a la precisión de la medida del volumen. Con nuestro experimento hemos confirmado que, aunque la sonda VL13-5 opera en un amplio rango de frecuencias, que en principio debería valer para escanear territorios tanto superficiales como profundos, su precisión es pobre a la hora de cuantificar el volumen de placas pequeñas situadas por debajo de los 5cm de profundidad, manteniendo una excelente precisión si se localizan superficialmente entre los 2 -3 cm de profundidad (Figura 31).

En este sentido, es importante recordar que el territorio arterial más frecuentemente afectado en los estadios precoces de la enfermedad aterosclerótica es el territorio femoral, seguido del carotideo, como nos muestran los resultados de la cohorte basal del estudio PESA Figura 29 (95). Ambos territorios son superficiales y no se verían sujetos a las limitaciones de este método para la exploración de territorios profundos. Por lo tanto, la ecografía vascular 3D real es una herramienta precisa, pudiéndose implementar con confianza en estrategias que busquen la detección y cuantificación de la aterosclerosis subclínica incluso desde sus estadios más precoces.

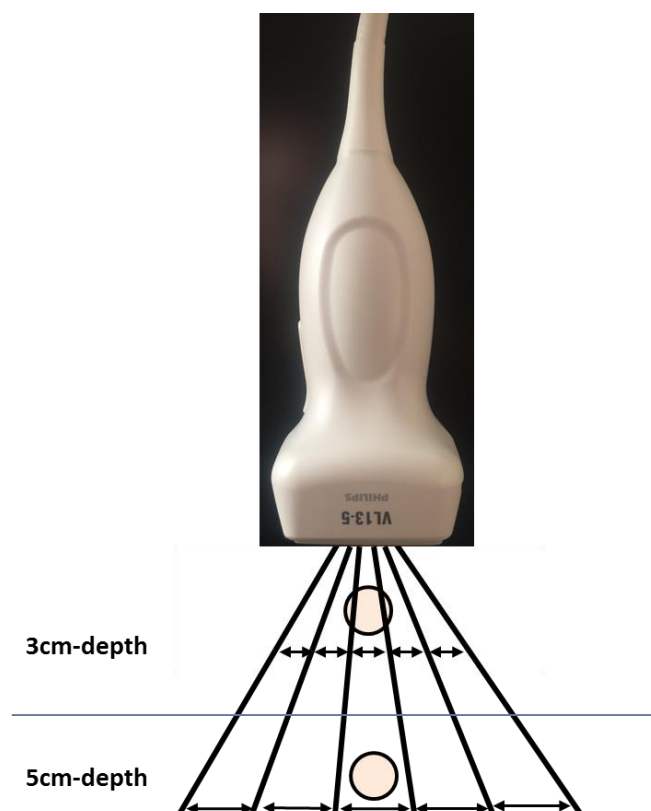


Figura 31 Esquema del barrido “en abanico” y su efecto sobre la resolución de la imagen de una placa pequeña con la profundidad

A mayor profundidad se incrementa la distancia entre *frames* que se representa como flechas de doble dirección (↔) postulándose este efecto como el causante de la pérdida de precisión en la cuantificación del volumen de placa en territorios por debajo de 5cm de profundidad (5cm-depth).

6.2. PRECISIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DEL VOLUMEN DE ATEROSCLEROSIS *IN VIVO*

Este trabajo es además el primer estudio que evalúa la precisión *in vivo* de la cuantificación del volumen de placa comparándose con el que ha venido siendo el *gold standard* para la validación de las técnicas de imagen en aterosclerosis, el análisis histológico de las placas. Los resultados muestran una buena correlación entre la medida por ecografía vascular 3D real y el análisis por histología de placas de pequeño e intermedio tamaño, entre 4 y 96 mm³, no complicadas y con calcificaciones ligeras. Y es que, el estudio histológico se diseñó para probar la precisión del nuevo método en la medida más exigente, que es la de los volúmenes pequeños de placa, y donde una futura aplicación clínica puede llegar a tener mayor relevancia, que es en la evaluación de la aterosclerosis en estadios precoces.

Al ser nuestro objetivo más ambicioso y querer determinar la precisión en placas pequeñas en estadios precoces, no fue posible realizar este estudio en muestras humanas de endarterectomía como se ha venido haciendo clásicamente para validar las técnicas de imagen en aterosclerosis. En cambio, nuestro grupo tiene una gran experiencia en modelos de aterosclerosis en animales, sobretodo en la inducción de placas de morfología y composición similar a la aterosclerosis humana (116, 118-121). Además la aorta abdominal del conejo New Zealand White, como se ha comentado, tiene unas dimensiones y se localiza a una profundidad similar a los territorios arteriales periféricos superficiales humanos, como las carótidas o las femorales.

Aprovechando las posibilidades que ofrecen los estudios en modelos animales, se planteó además establecer la precisión de la medida de carga de aterosclerosis que ofrece el método del barrido manual 2D/pseudo-3D. Este método ha sido el más ampliamente usado en clínica como estimador de la carga de enfermedad aterosclerótica en el individuo (98, 101) a

pesar de las conocidas limitaciones en la consistencia de su estimación mediante la suma de las áreas de la placa. Sin embargo, su precisión nunca antes había sido establecida. Los resultados mostraron una pobre correlación entre la suma de áreas de la placa medida con ecografía manual 2D/pseudo-3D frente a la suma de áreas por histología, consistentes, como cabría esperar, con los datos comunicados en los estudios de reproducibilidad de este método. Es por tanto que el método de ecografía 3D real ha demostrado ser preciso en la cuantificación de la carga o volumen de aterosclerosis, tanto *in vitro* como *in vivo* frente al *gold standard* de la histología, siendo mejor que el método tradicional del barrido manual 2D/pseudo-3D, el método hasta ahora apoyado por los datos clínicos.

Respecto al *gold standard* de las medidas en histología, la fijación y procesado de los especímenes anatópatológicos se ha descrito que puede producir cambios relativos en las dimensiones de las placas. Generalmente, la fijación en formalina y posterior inclusión en parafina de muestras biológicas conlleva una retracción de los tejidos y una disminución proporcional de sus dimensiones (129-131). Siegel et al a finales de los años 80 (132) fue el primero en describir los posibles cambios asociados al procesamiento de las muestras histológicas de placas y su magnitud para que sirvieran como referencia en la validación de las primeras imágenes de angiografía frente a histología que valoraban el tamaño y grado de obstrucción de la enfermedad coronaria. En su trabajo concluye que los cambios no son constantes sino que se ven modulados por los químicos y los tiempos usados en el procesamiento, pero, específicamente observó que en el procesado de las placas, los cambios variaban de una manera llamativa en función de la severidad de la aterosclerosis. Siegel encontró que las arterias con enfermedad ligera o placas pequeñas no se veían significativamente afectadas por el efecto de retracción cuando se medía el área de la placa procesada, manteniendo unas dimensiones similares a las del espécimen fresco. En cambio, las placas de mayor tamaño (moderadas-severas) sufrían una retracción y disminución de sus

dimensiones similares a las descritas para otros tejidos. Esta pequeña retracción en la aterosclerosis ligera, sin cambios significativos en el área de placa medido en histología, es la que cabría esperar en las muestras de nuestro experimento con los conejos, y por ello se puede explicar que en nuestro estudio veamos una buena correlación entre el volumen de las placas medido por histología frente a la medición *in vivo* por ecografía vascular. Además, estudios posteriores han demostrado que utilizando métodos más actuales y perfeccionados en el procesamiento de las muestras histológicas como los utilizados para nuestro estudio, se ocasionan menores cambios y artefactos por la retracción de los especímenes, como por ejemplo se describe en los trabajos de Dobrin et al (133) o el más reciente el de Choy et al (134) en los que sólo se modificaba la medición de los diámetros interno y externo de las secciones axiales de las arterias en torno al 5% de su medida en fresco.

Respecto a la idoneidad de haber diseñado un estudio de validación *in vivo* en un modelo animal para nuestro propósito, no ha sido sólo por compararnos con el *gold standard* de la histología, sino porque es la manera de establecer la robustez de una técnica de imagen trabajando en las condiciones fisiológicas y hemodinámicas de la aterosclerosis. Los fantasmas, aunque se diseñaron con tamaños diferentes y sus formas, por tanto, fueron variables entre unos y otros, no pueden establecer el efecto de la composición o ecodensidad de la placa, especialmente el efecto de la presencia de calcio o de la morfología de la superficie de la placa, en la precisión del método de evaluación. Es sólo mediante los estudios *in vivo* la manera de determinarlo, y por ello se establecieron tanto el experimento de validación en el modelo de conejo, para poder tener la correlación con la histología, como el experimento de viabilidad, fiabilidad y reproducibilidad en una cohorte de pacientes.

Así pues, el estudio de validación *in vivo* en el modelo de conejo mostró una correlación entre el volumen real y el medido por ecografía 3D tan bueno como la correlación obtenida en

el modelo *in vitro* de los fantasmas. Esto es indicativo de que la técnica obtiene una resolución de las imágenes que permite evaluar las placas con una elevada fiabilidad siempre que sean placas con calcificaciones ligeras no complicadas como las que se indujeron en los conejos. Además, los resultados de este experimento son representativos del efecto que ocasionan las condiciones hemodinámicas con las que se escanea la placa, como la pulsatilidad de la arteria, otro determinante relevante en los estudios de imagen. Aunque la imagen 3D del método estudiado no se sincroniza con el ECG, la rapidez con la que se produce el barrido interno y el mantener la sonda fija con cierta presión sobre el vaso inmovilizándolo, parece preservar la resolución de la imagen, evitando artefactos significativos de movimiento, y por tanto la precisión en la determinación del volumen de la placa es similar a la precisión obtenida en el estudio *in vitro* donde no se tiene este efecto. Resaltar que en nuestro modelo de aterosclerosis en conejos, las condiciones hemodinámicas, las velocidades del flujo medidas con doppler espectral 2D y los índices determinados durante las adquisiciones que pueden condicionar la calidad de la imagen 3D, fueron similares a los descritos para una arteria carótida humana adulta (Velocidad sistólica de entre 78 y 118 cm/s, Velocidad telediastólica de entre 20 y 32 cm/s, índice de resistencia de entre 0.72 y 0.84) (135), apoyando la traslación de nuestros resultados de precisión en la detección y cuantificación de la aterosclerosis evaluada en este modelo animal si se aplicara en humanos.

6.3. VIABILIDAD, CONCORDANCIA Y REPRODUCIBILIDAD DE LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS SUBCLÍNICA CON ECOGRAFÍA VASCULAR 3D REAL

Para completar este trabajo de validación, y viendo los buenos resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, se diseñó este experimento buscando establecer el potencial rendimiento de la ecografía vascular 3D real en la práctica clínica para detectar y cuantificar la aterosclerosis

subclínica y compararlo con los métodos hasta ahora utilizados de ecografía vascular 2D. Centrando nuestro interés igualmente en la evaluación de la aterosclerosis precoz, seleccionamos una muestra de entre la cohorte de individuos reclutados para el estudio PESA, un subgrupo representativo de la situación de la enfermedad aterosclerótica subclínica en la población de entre 40 y 55 años. Nuestros resultados muestran que el 3D real es un método viable, y el protocolo de exploración que proponemos, sería fácil de integrar en la evaluación del riesgo CV de cualquier individuo en una consulta o departamento clínico. Además es fiable y consistente en el diagnóstico de la enfermedad de una manera similar a la técnica convencional 2D, y muy reproducible en su medición de la carga o volumen de placa cuando se aplica al estudio de la aterosclerosis carotídea y femoral.

6.3.1. Viabilidad del protocolo

El método de ecografía 3D real ha demostrado ser viable en el estudio de la aterosclerosis precoz a nivel de las arterias carótidas y femorales de una manera similar al barrido manual 2D, no observándose diferencias en la ventana ecográfica ni en la obtención de imágenes analizables entre ambas técnicas.

Respecto a la viabilidad concreta de la ecografía vascular 3D real, existen dos estudios que la han valorado previamente. Ambos estudios se limitan a la valoración de las arterias carótidas y observaron que dependiendo del contexto clínico en el que se aplicaba, la evaluación 3D real se ha llegado a considerar una técnica con limitaciones para el análisis de la carga de aterosclerosis. Uno de ellos es el estudio de Kalashyan et al (111), en el que hasta el 33% de las adquisiciones carotídeas se dieron como no analizables cuando se exploraban con el nuevo método a pacientes que habían padecido un ictus reciente. El otro es el estudio de Graebe et al (30) en el que fue el 23% de las adquisiciones las que se dieron como no válidas para un análisis de la carga de placa cuando se aplicaba a pacientes con enfermedad arterial periférica severa

sometidos a cirugía de revascularización. La presencia de un alto porcentaje de placas con calcificación severa o muy severa en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida avanzada fue el hecho común de estas tasas de fracaso de la herramienta 3D, algo no sorprendente ya que el calcio es la principal limitación para la valoración de cualquier estructura con ultrasonidos, tanto 2D como 3D, debido a las sombras posteriores que produce. En nuestro estudio, ninguna adquisición fue definida como no válida para el análisis de la carga de placa al no encontrarse placas con calcificaciones importantes por ser una población de bajo riesgo y asintomática. Por este hecho, podemos decir que la nueva herramienta 3D tiene un mejor rendimiento en la evaluación de la aterosclerosis precoz en comparación con los resultados publicados para la enfermedad avanzada, la que ha sido su única aplicación clínica hasta ahora.

Tampoco se encontraron limitaciones que no pudieran superarse combinando el uso de la herramienta semiautomática con la posibilidad de edición manual del análisis 3D por el observador. Lo que caracterizó nuestra muestra fue la presencia de un alto porcentaje de placas de aterosclerosis hipoecoicas, y son estas las que obligaron a editar manualmente los contornos del análisis 3D y por tanto no poder utilizar la herramienta semiautomática exclusivamente. Ésta se basa en la detección de los contornos por escala de grises, y las placas “blandas” tienen una pobre definición por un pobre contraste entre su superficie y la luz del vaso, de manera que la herramienta semiautomática no logró detectar su contorno adecuadamente. De hecho, hasta el 36% de los territorios precisaron de una edición manual de los contornos de las placas por este motivo. Aunque se necesitó utilizar en un alto porcentaje de territorios la herramienta manual, todas las placas excepto una, localizada en el bulbo carotideo, pudieron ser detectadas y cuantificadas con una buena concordancia con la detección de la técnica tradicional 2D y con una buena reproducibilidad intra e inter-observador en la cuantificación del volumen de placa. Por ello, nuestros datos son los primeros en indicar que usando la combinación del análisis

semiautomático y manual 3D, se pueden detectar la enfermedad aterosclerótica precoz de carótidas y femorales de manera similar a la detección con el 2D.

6.3.2. Fiabilidad y concordancia en la detección de placas carotideas y femorales

Se ha venido discutiendo sobre la estrategia ideal para escanear los territorios arteriales con ecografía vascular 3D. El protocolo utilizado hasta ahora ha consistido en evaluar la carga de aterosclerosis del individuo centrandó el estudio en el volumen de la placa más representativa en cada territorio. Esta estrategia ha conseguido resultados prometedores en los primeros resultados clínicos que la han aplicado (98, 101). En nuestro caso, al querer aplicar la técnica en una cohorte con aterosclerosis precoz, proponemos evaluar la carga de aterosclerosis del individuo centrandó el estudio en un segmento, en concreto en las bifurcaciones, que es donde se ha descrito que aparecen los primeros indicios de la enfermedad por las turbulencias del flujo de sangre a ese nivel (136). También postulamos otras ventajas que ofrecería la evaluación estandarizada de un segmento frente a seleccionar la placa de mayor entidad, como por ejemplo, que ofrecería una mayor concordancia en el seguimiento de los pacientes, ya que puedes estar eligiendo otra placa diferente a la que evaluaste la primera vez si centras el estudio sólo en las placas; o que no perderías información de otras placas más pequeñas adyacentes y que en el seguimiento puedan ser las que sufran mayores cambios; o que mejoraría la reproducibilidad inter-observador al no seguir un criterio subjetivo de elegir una única placa como la significativa, mejorando la generalización de los resultados obtenidos por un grupo pudiendo extender cualquier valor de corte a otros centros clínicos.

Con la muestra seleccionada del estudio PESA hemos constado que centrandó la adquisición en el bulbo carotideo y en la bifurcación femoral se consigue detectar casi la totalidad de las placas que reveló la técnica convencional 2D. Quizá ha sido en las femorales donde se ha perdido algo más de información ya que un pequeño porcentaje, 3 placas de las 41

placas femorales, se encontraron alejadas de la bifurcación, 2 porque se encontraban en la porción medio-distal de las ramas superficial y profunda respectivamente, y una porque era muy proximal localizándose en la transición iliaco-femoral, quedando fuera del campo de visión de la adquisición estandarizada de 30 grados (barrido automático de unos 6 cm de longitud). Por otro lado, la concordancia en la detección de la presencia de placas entre el 3D real y la técnica 2D fue muy buena, apoyando la fiabilidad del propio método 3D para la detección de la aterosclerosis precoz en carótidas y femorales. En definitiva, los datos de nuestro trabajo apoyarían el uso del 3D en futuros protocolos para la detección de la enfermedad subclínica mediante la estandarización de la adquisición centrada en la evaluación del segmento que engloba la bifurcación femoral y el bulbo carotideo. El valor clínico de éste protocolo será establecido con los datos de los estudios poblacionales en curso que lo están utilizando, como son el estudio PESA y el estudio AWHs.

6.3.3. Reproducibilidad de la medida del volumen de placa en carótidas y femorales

Nuestro estudio ha sido el primero en describir la buena reproducibilidad intra e inter-observador tanto en la detección como en la cuantificación del volumen de placa o carga de aterosclerosis subclínica en sus estadios precoces. Recordar que la carga de aterosclerosis la establecimos como la suma de todos los volúmenes de las placas encontradas en la exploración estandarizada de las arterias carótidas y femorales como se ha comentado en el apartado anterior. Esta estrategia, por tanto demuestra tener una buena reproducibilidad y podría ser susceptible de generalizarse a estrategias aplicadas a la población general. Sobre la reproducibilidad de la medida del volumen de placa, Kalashyan (111) and Graebe (30) coincidieron en publicar unos buenos resultados usando la metodología 3D real con la sonda lineal-volumétrica pero limitándose a la medición del volumen carotideo en placas avanzadas de gran tamaño. Nuestro trabajo es por tanto también el primero en analizar por separado la

reproducibilidad en las carótidas y femorales, demostrando resultados igualmente buenos para ambos territorios en el contexto de la aterosclerosis precoz.

La buena reproducibilidad de la ecografía 3D real es un hallazgo importante, ya que permitiría detectar con precisión pequeños cambios en la carga de placa de un individuo a través del tiempo. Sólo un estudio, el de Ainsworth et al (137), comprobó la precisión con la que el método 3D con guía mecánica externa era capaz de detectar cambios en el seguimiento de la aterosclerosis en pacientes bajo tratamiento con estatinas. Sus resultados fueron espectaculares ya que consiguió diferenciar cambios en el volumen de las placas con sólo 3 meses de seguimiento, observando una tasa de progresión de $16.81 \pm 74.10 \text{ mm}^3$ en los pacientes que tomaban placebo frente a una regresión de $-90.25 \pm 85.12 \text{ mm}^3$ en los que tomaron atorvastatina 80 mg al día ($p < 0.0001$). Estudios clínicos como el PESA, también ayudarán a constatar la precisión del nuevo método de ecografía 3D real en el seguimiento para la detección de la progresión o regresión de la aterosclerosis, pero su buena precisión y reproducibilidad, la convierten en una técnica potencialmente ideal para este objetivo.

Respecto al efecto de proporcionalidad que, aun no significativo, se puede apreciar en la representación gráfica de Bland-Altman, comentar que en los estudios de Kalashyan (111) and Graebe (30) también se intuía este efecto (Figura 32) en el que a mayor tamaño de placa se aprecia un incremento de las diferencias absolutas entre mediciones. El hecho de que parezca algo más marcado en nuestra muestra se relaciona con la distribución no normal o asimétrica de los tamaños de placas que encontramos, que van desde 3.6 a 242.7 mm^3 concentrándose casi más de la mitad de la muestra en valores por debajo de los 50 mm^3 y la otra mitad entre 50 y 200 mm^3 . Sin embargo y a pesar de esta distribución tan asimétrica, menos del 5% de las mediciones salieron por fuera de los límites de concordancia. Además amortiguando esta

distribución tan asimétrica con la aplicación de una transformación logarítmica a los volúmenes de placa, observamos que la distribución de las diferencias se homogeneizaba.

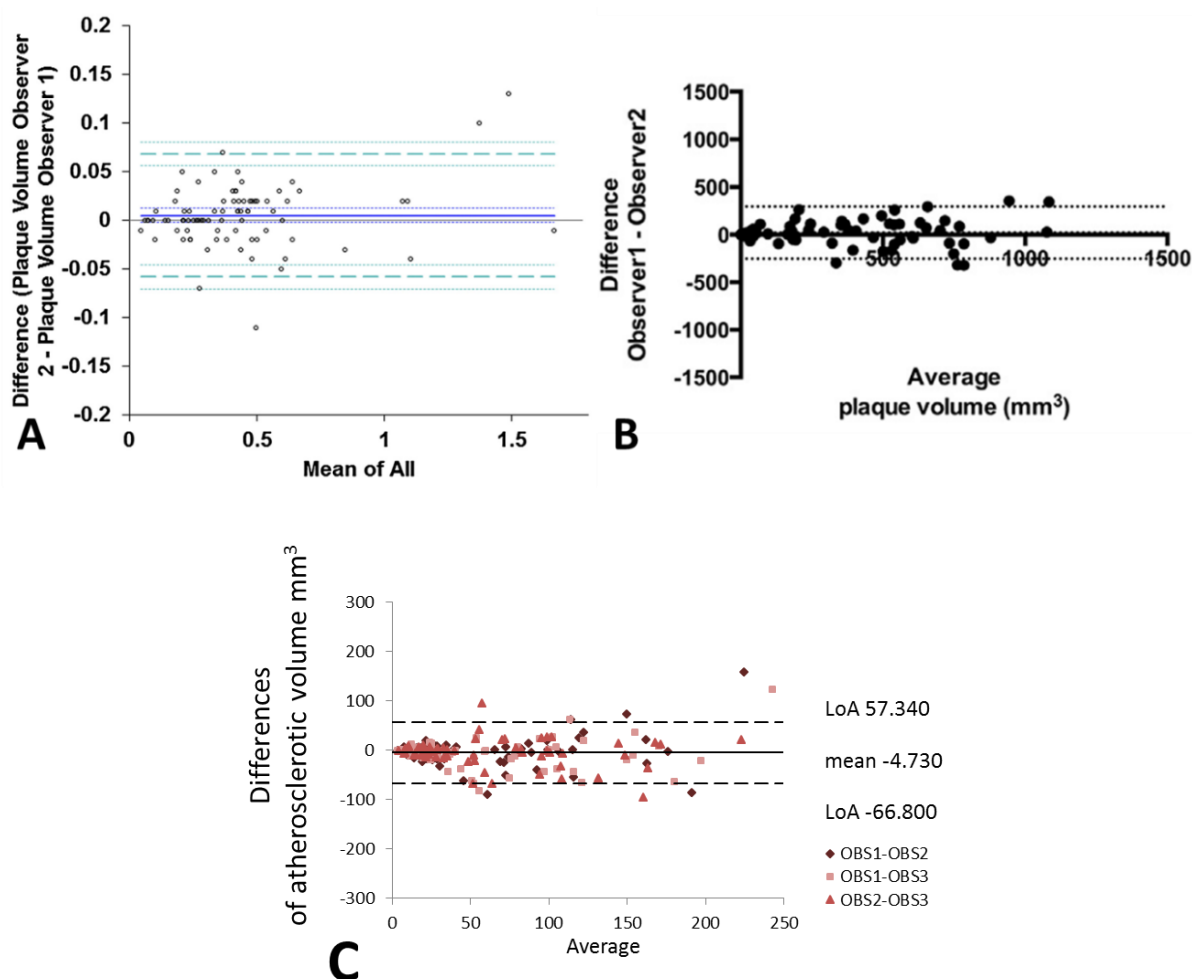


Figura 32 Reproducibilidad de la medida del volumen por 3D real en su representación gráfica de Bland-Altman.

Figura A tomada de Kalashyan et al (111), figura B tomada de Graebe et al (30) y figura C nuestros resultados.

6.4. LIMITACIONES

6.4.1. Limitaciones del trabajo

6.4.1.1. Limitaciones del experimento *in vitro*

Una de las limitaciones en el experimento *in vitro* es el número de fantomas que se diseñaron, aunque las publicaciones anteriores a éste trabajo han utilizado un aún menor número de fantomas para probar la precisión y se limitaron a usar fantomas de volúmenes

grandes sin probar otras características como la profundidad. Entendemos, que el efecto de la profundidad en nuestro experimento se limitó a la valoración de un set de sólo 3 fantomas. Aun con lo limitado de la muestra, los resultados de la precisión para la profundidad de 2-3cm frente a los resultados de los >5cm fueron muy llamativos, destapando la influencia de la profundidad en la precisión de la medición con una “n” pequeña.

También, señalar que los fantomas no fueron diseñados específicamente para imitar diferentes morfologías de las placas. Aunque al diseñarlos con diferentes tamaños sus morfologías variaban, el experimento no se controló para ver el efecto de la morfología en la precisión de la cuantificación del volumen. Para compensar este hecho, se realizó el experimento *in vivo*, en el que se pudo establecer la precisión en placas reales de distinta morfología y composición.

Otra limitación sería el cálculo del “volumen real” de los fantomas, que al final resulta de una estimación derivada de otras mediciones con sus propias limitaciones, en nuestro caso su peso y la densidad de su composición. Otra forma de calcularlo hubiera sido mediante el cálculo del desplazamiento del agua por el método de Arquímedes. Éste método se desestimó dado que el agua desplazada se ve influenciada por el índice de flotabilidad del material sumergido y la tensión superficial del agua, en nuestro caso, la flotabilidad del poliuretano unido al pequeño volumen de las placas hizo muy complicado cuantificar el agua desplazada. Sin embargo, la báscula de alta precisión mostró un error mínimo del peso seco de las placas (precisión de 0.1 ± 0.1 mg) y la densidad del material era estable en las condiciones en las que se utilizó.

6.4.1.2. Limitaciones del experimento in vivo

Las limitaciones de los estudios que buscan compararse con el *gold standard* de la histología son bien conocidas y se discuten ampliamente en la bibliografía. Una de ellas es

justificar una correcta colocación entre la imagen y la histología para asegurar la precisión en los resultados obtenidos. Con este objetivo, el experimento se limitó a las placas que aparecían en la proximidad de estructuras anatómicamente estables y reproducibles tanto en la imagen como en la muestra histológica, aun así, no se pueden descartar pequeños desfases entre las “rodajas” obtenidas por ambos métodos y que puedan influenciar la estimación de la precisión de la medida del volumen o de la suma de áreas. También señalar que para el análisis de los contornos de la íntima, media y adventicia en las muestras histológicas no se usaron tinciones específicas, como tinción para las fibras elásticas. Tampoco se usaron tinciones específicas para determinar los componentes de las placas, porque, aunque el experimento no se estableció para determinar la composición, podrían haber colaborado a establecer con una mayor exactitud los límites de las áreas. Tampoco se utilizaron tinciones específicas para determinar la calcificación de las placas. Es conocida la influencia que tiene la presencia de calcio en la detección y cuantificación de las placas por cualquier técnica que utilice ultrasonidos y por ello quisimos detectar la presencia de calcificación en nuestras muestras. Aunque la tinción de hematoxilina-eosina es capaz de detectar aceptablemente el calcio, incluso estimamos indirectamente su cantidad con el método del score cálcico con TAC concluyendo que las placas obtenidas en el modelo presentaban calcificaciones ligeras, no se utilizaron tinciones específicas para dirigir específicamente su determinación y cuantificación.

En cuanto a la limitación ya comentada en la discusión de este trabajo sobre los fenómenos de retracción que sufren las muestras histológicas durante su procesado, resaltar que en nuestro caso concreto la mayoría de las placas de los conejos fueron incipientes, con volúmenes pequeños (rango entre 3.9 - 96 mm³) y no obstructivas, por lo que la retracción esperada sería ligera según el trabajo ya referido de Siegel et al (132) y otros trabajos posteriores con técnicas más modernas de preparación (133, 134). Aun así, el efecto sufrido por nuestras

muestras no fue evaluado, no pudiéndose descartar la presencia de cierto efecto por la retracción en nuestros resultados.

Además del efecto de retracción por el procesado, la arteria también sufre cambios en sus dimensiones simplemente por presentarse vacía sin la presión que ejerce el flujo sanguíneo en su luz. Éste efecto sería más marcado si cabe en arterias con aterosclerosis ligera que conservan cierta elasticidad. Sin embargo, ésta potencial limitación no está bien definida en la literatura, y nosotros tampoco la hemos determinado directamente en nuestro experimento. En cambio, al haber diseñado un estudio de validación global incluyendo modelos *in vitro* e *in vivo*, indirectamente hemos podido evaluar la influencia de las condiciones hemodinámicas y de la pulsatilidad del flujo en la arteria al obtener en ambos experimentos una igualmente buena correlación entre la medida del volumen con ecografía 3D con el volumen real de los fantasmas y el volumen real de la histología, habiéndose realizado las adquisiciones una en un modelo sin movimiento, el fantoma, y otra *in vivo*. Reseñar también, que la posibilidad de haber usado, en vez de un modelo animal de aterosclerosis en el que se debe justificar que la composición de las placas es similar a la composición de las placas humanas, un modelo de placas precoces en, por ejemplo, cadáveres humanos, se desestimó por no ser un modelo en el que se pudiera definir la precisión de la ecografía 3D en condiciones fisiológicas y hemodinámicas de pulsatilidad y flujo en la arteria.

6.4.1.3. Limitaciones del experimento en participantes del estudio PESA

Como se describe en el apartado de métodos, la población del estudio PESA, de donde se extrajo la muestra de participantes con aterosclerosis precoz para el análisis de la viabilidad, fiabilidad y reproducibilidad en la detección y cuantificación de la aterosclerosis, es una población de joven de banqueros. Aunque, en sus características epidemiológicas, especialmente la incidencia de factores de riesgo cardiovascular, no se detectaron diferencias

relevantes con las descritas para la población general española de similar rango de edad (95), lo específico de su profesión, que determina de alguna manera su nivel sociocultural y sus posibles hábitos de vida o nivel de estrés entre otros, no se puede descartar que nuestros resultados pudieran verse limitados en su extrapolación a la población general de mediana edad porque la aterosclerosis que presentaran no se viera en el mismo estadio que los participantes del PESA. Además, estos resultados serían sólo aplicables a la aterosclerosis subclínica, que en nuestra muestra fueron placas de volúmenes entre pequeños y moderados (rango 3.6 y 242 mm³) en ningún caso obstructivas ni complicadas y con calcificaciones no severas que produzcan sombras acústicas significativas. El hecho de centrar el foco de nuestra validación en la aterosclerosis incipiente obedece a que es donde se habían detectado las principales limitaciones de los antiguos métodos de ecografía vascular 3D y donde existe una mayor escasez de evidencia científica sobre la fiabilidad del método. También se eligió este objetivo concreto, por ser lo que se persigue en los estudios en los que nuestro grupo busca aplicar el nuevo método.

También resaltar que sólo se ha probado la validez del método para las arterias carótidas y femorales. Otros territorios periféricos y superficiales, condiciones fundamentales para aplicar con confianza este método de ecografía 3D según nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo*, como por ejemplo las arterias poplíteas, no se ha determinado, aunque tampoco existe una evidencia suficiente que apoye su exploración para la evaluación del riesgo cardiovascular en la actualidad.

Aunque la viabilidad y factibilidad del método se haya demostrado muy buena y reproducible en nuestra muestra, señalar que nuestros técnicos en ecografía tenían experiencia previa en el estudio vascular convencional 2D y llevan entre 1 y 3 años trabajando con el 3D, de manera que nuestro estudio no evalúa la fiabilidad y reproducibilidad en ecografistas menos

experimentados, ni el tiempo exacto de formación y entrenamiento necesario, para que un nuevo laboratorio que quiera implementar esta tecnología, llegara a alcanzar estos resultados.

6.4.2. Limitaciones de la técnica de ecografía 3D

Como limitaciones de la tecnología de ecografía 3D aplicada a la detección y cuantificación de la aterosclerosis precoz, decir que aunque se ha demostrado que su adquisición es rápida y sencilla, requiere en un no despreciable porcentaje de casos un análisis de las imágenes de manera manual como se describe en el apartado de la discusión. Por un lado, se resalta la ventaja de que el paciente no tiene que someterse a largas e incómodas exploraciones, pero el técnico o médico que realiza el análisis, en aproximadamente un 36% de los casos según nuestros resultados, invertiría más tiempo que si la herramienta semiautomática detectara adecuadamente los contornos de las placas. Decir también, que con el entrenamiento, nuestros técnicos han reducido el tiempo que toma un análisis manual, aunque en este estudio no se tomaron los datos exactos de tiempo de análisis.

Otra limitación documentada en este trabajo es la del efecto de la profundidad en la precisión de las medidas con 3D. Todavía están por desarrollarse prototipos de sondas para los estudios vasculares cuya adquisición sea volumétrica en vez de que utilicen un barrido automático ya que, es esta adquisición en abanico, la que se postula como la causa de la limitación con la profundidad. En cualquier caso, la adquisición volumétrica también tiene sus limitaciones como se ha detectado en aplicaciones ya extendidas como en el estudio del corazón, viéndose también limitada por la profundidad, la ventana ecográfica y la necesidad de un correcto *gating* cardiaco.

En cuanto a la capacidad de caracterizar la composición de la placa con ecografía vascular 3D, este estudio no se diseñó para su valoración. Aunque a la vista de nuestra

experiencia, el modelo de aterosclerosis precoz en conejo que utilizamos, podría servir para este propósito en trabajos futuros.

6.5. APORTACIÓN DE LA ECOGRAFÍA 3D FRENTE A LAS TÉCNICAS BASADAS EN LA ECOGRAFÍA 2D

En este trabajo hemos demostrado que la viabilidad y la fiabilidad de la detección de la aterosclerosis precoz con ecografía 3D es similar a la de las técnicas convencionales basadas en el 2D, sin embargo, la ecografía 3D no sólo iguala, sino que además mejora, las condiciones del 2D en otras características. En primer lugar, la ecografía 3D es más fácil de estandarizar a la hora de la adquisición, como hemos descrito en nuestra propuesta de un protocolo clínico centrado en las bifurcaciones, y además estandariza el análisis, ya que la herramienta semiautomática ayuda a introducir menores errores que un análisis manual. De manera que, como hemos visto, mejora la reproducibilidad entre diferentes ecografistas y mejora la variabilidad de la adquisición y el análisis, un valor potencialmente útil a la hora de hacer, por ejemplo, estudios de seguimiento para detectar cambios en las placas.

Además la ecografía 3D aporta una medida global e integradora de la placa como es el volumen, que engloba, una valoración de la presencia, la extensión y el grado de afectación por aterosclerosis de un segmento vascular, a diferencia de las medidas 2D que van a depender de la región de la placa que el observador haya decidido subjetivamente que es la más representativa tanto en la adquisición como en el análisis. Es por esto que la medida de la carga de aterosclerosis sea el marcador de riesgo actualmente más prometedor y la medida precisa del volumen de aterosclerosis su mejor representante, dado su exactitud a la hora de determinar el grado de afectación y su reproducibilidad para extrapolar los resultados de los ensayos clínicos, establecer valores de corte o realizar seguimientos de progresión/regresión de la enfermedad aterosclerótica y su relación con el riesgo cardiovascular.

Otra de las aportaciones fundamentales validada en este proyecto, es la capacidad de detectar y cuantificar las placas pequeñas respecto a las técnicas basadas en el 2D a la hora de estimar la carga de aterosclerosis. Como se ha visto, sería la ecografía vascular 3D utilizando la sonda lineal volumétrica, la técnica de elección para estudiar la carga de aterosclerosis en estadios precoces subclínicos, ya que es la que ha demostrado ser más precisa en su cuantificación. La precisión en la cuantificación de la aterosclerosis, en nuestro caso mediante la medida del volumen, es fundamental para poder llegar a establecer, por ejemplo, puntos de corte reproducibles entre centros para las estrategias de prevención, indicar tratamientos o valorar cambios en el perfil de riesgo de un paciente, y el estadio subclínico o precoz de la enfermedad sería el momento ideal para encontrar marcadores que indicaran el inicio de cualquier medida en prevención primaria. Por ello, la ecografía 3D sería la técnica indicada para probar cualquier estrategia en prevención primaria de población joven o de mediana edad con el potencial de llegar a superar la capacidad de los métodos 3D basados en el 2D hasta ahora desarrollados.

6.6. UTILIDAD ACTUAL DE LA ECOGRAFÍA 3D

Actualmente, el uso clínico de la nueva herramienta 3D se limita a muy pocos centros hospitalarios, y fundamentalmente se ha utilizado para la valoración de placas carotídeas complicadas de pacientes que había sufrido un evento previo. Parece que la ecografía 3D en esta indicación es útil, ayudando a definir el diagnóstico de la severidad o la detección de úlceras que identificarían la placa responsable. Sin embargo, la evidencia en que se basan es esencialmente la comunicación de casos clínicos y por tanto muy limitada.

Donde se está empezando a explorar el potencial de esta técnica está siendo en estudios poblacionales de evaluación del riesgo CV, como el estudio “HRP BioImage study” en pacientes de moderado riesgo CV o el estudio PESA en pacientes de mediana edad

asintomáticos y de bajo riesgo CV. Es en este contexto de la estratificación cardiovascular donde están apareciendo los primeros datos con unos resultados muy prometedores. Aun así, esta tecnología es muy reciente, y necesitará de tiempo para introducirse y normalizar su uso en los centros clínicos gracias a la evidencia que traerán consigo los resultados de las mencionadas cohortes de pacientes. Este trabajo es por tanto una novedad en este campo que viene a apoyar la expansión de una técnica fiable, viable y reproducible, y da validez a los resultados que están por venir.

6.7. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES FUTURAS

Aplicaciones en un futuro cercano serían, la integración de la valoración 3D en las consultas de riesgo cardiovascular, como *screening* de enfermedad silente o en el seguimiento de tratamientos para la aterosclerosis, ya que es una herramienta no invasiva, que no radia, fácilmente disponible a pie de cama y cuyo coste es económico en comparación con otras pruebas médicas. Y es que la aterosclerosis es la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, y su prevalencia sigue incrementándose, ocasionando un importante gasto sanitario. En este sentido los ultrasonidos aventajarían a técnicas de imagen consolidadas en la evaluación del riesgo CV, como el score de calcio coronario por TAC, a la hora de extenderse con mayor facilidad como biomarcador de riesgo CV si se quisiera aplicar en la población.

Pero sobretodo, es de esperar un mayor desarrollo de esta tecnología y que en un futuro podamos hablar de la ampliación de la aplicación de la tecnología vascular 3D a otros territorios vasculares, como por ejemplo la aorta abdominal, un territorio considerado profundo (>5cm), o para la valoración tridimensional de otras patologías a nivel de ésta, como los aneurismas de aorta abdominal. Otras posibilidades serían su aplicación como guía de procedimientos terapéuticos invasivos, ya que la visión tridimensional mejora la interpretación de las relaciones

espaciales a la hora de insertar una endoprótesis o recorrer un vaso tortuoso con un dispositivo intravascular.

7. CONCLUSIONES

En respuesta a los objetivos propuestos de validar el nuevo método de ecografía vascular 3D real que utiliza la nueva sonda lineal-volumétrica para la detección y la cuantificación de placas de aterosclerosis típicas de fases precoces de la enfermedad aterosclerótica en diferentes territorios arteriales, las conclusiones de esta tesis son:

1. La medida del volumen de placa con el nuevo método de ecografía vascular 3D real es precisa independientemente del tamaño de la placa, y especialmente obtiene una excelente precisión en la cuantificación del volumen de placas pequeñas.
2. La precisión es alta cuando se cuantifica el volumen de placa en territorios arteriales superficiales, a una profundidad de 2-3 cm, como las carótidas y las femorales.
3. La precisión disminuye con la profundidad del territorio explorado, siendo pobre cuando se cuantifica el volumen de placas de territorios localizados a una profundidad igual o mayor a 5 cm.
4. La precisión en la estimación del volumen de placas ateroscleróticas es excelente cuando se realiza mediante la cuantificación del volumen por ecografía 3D real, mientras que cuando se utiliza la suma de las áreas de placa con ecografía 2D/pseudo-3D la precisión es menor.
5. La ecografía vascular 3D real es un método viable para estudiar la aterosclerosis subclínica desde sus estadios más precoces en territorios arteriales superficiales como las carótidas y las femorales.
6. La detección de las placas aplicando un protocolo estandarizado de ecografía vascular 3D real centrado en la adquisición en el segmento entorno al bulbo carotideo y la bifurcación femoral es similar a la detección por el barrido manual 2D sobretodo a nivel de las carótidas, apoyando la fiabilidad del protocolo de adquisición estandarizado sobre un segmento en el diagnóstico precoz de la enfermedad aterosclerótica.

7. El método de ecografía 3D real muestra una buena consistencia tanto intra como inter-observador para la detección de enfermedad precoz independientemente del territorio carotideo o femoral, incluso mejor que la detección por el método 2D.
8. La cuantificación del volumen de placa aterosclerótica con ecografía vascular 3D real es reproducible tanto intra como inter-observador, y la reproducibilidad es similar entre las placas carotideas y femorales.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alwan A AT, Bettcher D, Boerma T, Branca F, Mathers C, Martinez R, et al. Global Atlas on Cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization in collaboration with World Heart Federation and the World Stroke Organization 2011.
2. Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;110(5):522-7.
3. Schlendorf KH, Nasir K, Blumenthal RS. Limitations of the Framingham risk score are now much clearer. *Prev Med*. 2009;48(2):115-6.
4. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
5. Ware JH. The limitations of risk factors as prognostic tools. *N Engl J Med*. 2006;355(25):2615-7.
6. Schlendorf KH, Nasir K, Blumenthal RS. Limitations of the Framingham risk score are now much clearer. *Preventive medicine*. 2009;48(2):115-6.
7. Spence JD, Hackam DG. Treating arteries instead of risk factors: a paradigm change in management of atherosclerosis. *Stroke*. 2010;41(6):1193-9.
8. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2008;21(2):93-111.

9. Mathiesen EB, Johnsen SH, Wilsgaard T, Bonna KH, Lochen ML, Njolstad I. Carotid plaque area and intima-media thickness in prediction of first-ever ischemic stroke: a 10-year follow-up of 6584 men and women: the Tromso Study. *Stroke*. 2011;42(4):972-8.
10. Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, et al. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(15):1600-7.
11. Rundek T, Arif H, Boden-Albala B, Elkind MS, Paik MC, Sacco RL. Carotid plaque, a subclinical precursor of vascular events: the Northern Manhattan Study. *Neurology*. 2008;70(14):1200-7.
12. Belcaro G, Nicolaides AN, Ramaswami G, Cesarone MR, De Sanctis M, Incandela L, et al. Carotid and femoral ultrasound morphology screening and cardiovascular events in low risk subjects: a 10-year follow-up study (the CAFES-CAVE study). *Atherosclerosis*. 2001;156(2):379-87.
13. Heliopoulos J, Vadikolias K, Piperidou C, Mitsias P. Detection of carotid artery plaque ulceration using 3-dimensional ultrasound. *Journal of neuroimaging* 2011;21(2):126-31.
14. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999;340(1):14-22.
15. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *The Fifth*

Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*. 2012;33(13):1635-701.

16. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(25 Pt B):2935-59.

17. Goncalves I, Moses J, Pedro LM, Dias N, Fernandes e Fernandes J, Nilsson J, et al. Echolucency of carotid plaques correlates with plaque cellularity. *European journal of vascular and endovascular surgery* 2003;26(1):32-8.

18. Salem MK, Bown MJ, Sayers RD, West K, Moore D, Nicolaides A, et al. Identification of patients with a histologically unstable carotid plaque using ultrasonic plaque image analysis. *European journal of vascular and endovascular surgery* 2014;48(2):118-25.

19. Den Ruijter HM, Peters SA, Anderson TJ, Britton AR, Dekker JM, Eijkemans MJ, et al. Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. *JAMA*. 2012;308(8):796-803.

20. Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML, Moons KG. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. *Heart*. 2012;98(3):177-84.

21. Helfand M, Buckley DI, Freeman M, Fu R, Rogers K, Fleming C, et al. Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*. 2009;151(7):496-507.

22. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Desvarieux M, et al. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis*. 2004;18(4):346-9.

23. Rundek T, Blanton SH, Bartels S, Dong C, Raval A, Demmer RT, et al. Traditional risk factors are not major contributors to the variance in carotid intima-media thickness. *Stroke*. 2013;44(8):2101-8.
24. Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, Wannamethee G, Walker M, Nicolaides AN, et al. Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study. *Stroke*. 1999;30(4):841-50.
25. Mono ML, Karameshev A, Slotboom J, Remonda L, Galimanis A, Jung S, et al. Plaque characteristics of asymptomatic carotid stenosis and risk of stroke. *Cerebrovascular diseases*. 2012;34(5-6):343-50.
26. Nicolaides AN, Kakkos SK, Kyriacou E, Griffin M, Sabetai M, Thomas DJ, et al. Asymptomatic internal carotid artery stenosis and cerebrovascular risk stratification. *J Vasc Surg*. 2010;52(6):1486-96.
27. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2012;220(1):128-33.
28. Joakimsen O, Bonna KH, Stensland-Bugge E. Reproducibility of ultrasound assessment of carotid plaque occurrence, thickness, and morphology. The Tromso Study. *Stroke*. 1997;28(11):2201-7.
29. O'Leary DH, Polak JF, Wolfson SK, Jr., Bond MG, Bommer W, Sheth S, et al. Use of sonography to evaluate carotid atherosclerosis in the elderly. The Cardiovascular Health Study. CHS Collaborative Research Group. *Stroke*. 1991;22(9):1155-63.

30. Graebe M, Entekin R, Collet-Billon A, Harrison G, Sillesen H. Reproducibility of two 3-D ultrasound carotid plaque quantification methods. *Ultrasound Med Biol*. 2014;40(7):1641-9.
31. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(25 Pt B):2889-934.
32. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) developed in collaboration with the Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(3):378-402.
33. Hoff JA, Chomka EV, Krainik AJ, Daviglius M, Rich S, Kondos GT. Age and gender distributions of coronary artery calcium detected by electron beam tomography in 35,246 adults. *Am J Cardiol*. 2001;87(12):1335-9.
34. Martin SS, Blaha MJ, Blankstein R, Agatston A, Rivera JJ, Virani SS, et al. Dyslipidemia, coronary artery calcium, and incident atherosclerotic cardiovascular disease: implications for statin therapy from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2014;129(1):77-86.

35. Zavodni AE, Wasserman BA, McClelland RL, Gomes AS, Folsom AR, Polak JF, et al. Carotid artery plaque morphology and composition in relation to incident cardiovascular events: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Radiology*. 2014;271(2):381-9.
36. Gibson AO, Blaha MJ, Arnan MK, Sacco RL, Szklo M, Herrington DM, et al. Coronary Artery Calcium and Incident Cerebrovascular Events in an Asymptomatic Cohort: The MESA Study. *JACC Cardiovascular imaging*. 2014;7(11):1108-15.
37. McClelland RL, Chung H, Detrano R, Post W, Kronmal RA. Distribution of coronary artery calcium by race, gender, and age: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation*. 2006;113(1):30-7.
38. Rumberger JA, Kaufman L. A rosetta stone for coronary calcium risk stratification: agatston, volume, and mass scores in 11,490 individuals. *AJR American journal of roentgenology*. 2003;181(3):743-8.
39. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(18):1860-70.
40. Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation*. 1995;92(8):2157-62.
41. Baumgart D, Schmermund A, Goerge G, Haude M, Ge J, Adamzik M, et al. Comparison of electron beam computed tomography with intracoronary ultrasound and coronary angiography for detection of coronary atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30(1):57-64.

42. Tinana A, Mintz GS, Weissman NJ. Volumetric intravascular ultrasound quantification of the amount of atherosclerosis and calcium in nonstenotic arterial segments. *Am J Cardiol.* 2002;89(6):757-60.
43. Haberl R, Becker A, Leber A, Knez A, Becker C, Lang C, et al. Correlation of coronary calcification and angiographically documented stenoses in patients with suspected coronary artery disease: results of 1,764 patients. *Journal of the American College of Cardiology.* 2001;37(2):451-7.
44. Valenti V, B OH, 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 Cardiovascular imaging.* 2015;8(8):900-9.
45. Sibley C, Blumenthal RS, Merz CN, Mosca L. Limitations of current cardiovascular disease risk assessment strategies in women. *J Womens Health.* 2006;15(1):54-6.
46. 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;119(3):382-9.
47. Marwan M, Ropers D, Pflederer T, Daniel WG, Achenbach S. Clinical characteristics of patients with obstructive coronary lesions in the absence of coronary calcification: an evaluation by coronary CT angiography. *Heart.* 2009;95(13):1056-60.
48. 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. *Journal of the American College of Cardiology.* 2015;65(13):1273-82.

49. Gill EA, Jr. Does statin therapy affect the progression of atherosclerosis measured by a coronary calcium score? *Current atherosclerosis reports*. 2010;12(2):83-7.
50. Kelly JL, Thickman D, Abramson SD, Chen PR, Smazal SF, Fleishman MJ, et al. Coronary CT angiography findings in patients without coronary calcification. *AJR American journal of roentgenology*. 2008;191(1):50-5.
51. Mani V, Woodward M, Samber D, Bucarius J, Tawakol A, Kallend D, et al. Predictors of change in carotid atherosclerotic plaque inflammation and burden as measured by 18-FDG-PET and MRI, respectively, in the dal-PLAQUE study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2014;30(3):571-82.
52. El Aidi H, Mani V, Weinshelbaum KB, Aguiar SH, Taniguchi H, Postley JE, et al. Cross-sectional, prospective study of MRI reproducibility in the assessment of plaque burden of the carotid arteries and aorta. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(3):219-28.
53. Helft G, Worthley SG, Fuster V, Fayad ZA, Zaman AG, Corti R, et al. Progression and regression of atherosclerotic lesions: monitoring with serial noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2002;105(8):993-8.
54. 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;9(3):615-20.
55. Corti R, Fuster V. Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging. *Eur Heart J*. 2011;32(14):1709-19b.
56. Sirol M, Fuster V, Fayad ZA. Plaque imaging and characterization using magnetic resonance imaging: towards molecular assessment. *Curr Mol Med*. 2006;6(5):541-8.

57. Fayad ZA, Fuster V. Characterization of atherosclerotic plaques by magnetic resonance imaging. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:173-86.
58. Fayad ZA, Fuster V. The human high-risk plaque and its detection by magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol.* 2001;88(2a):42e-5e.
59. Fleg JL, Stone GW, Fayad ZA, Granada JF, Hatsukami TS, Kolodgie FD, et al. Detection of high-risk atherosclerotic plaque: report of the NHLBI Working Group on current status and future directions. *JACC Cardiovascular imaging.* 2012;5(9):941-55.
60. Saam T, Hetterich H, Hoffmann V, Yuan C, Dichgans M, Poppert H, et al. Meta-analysis and systematic review of the predictive value of carotid plaque hemorrhage on cerebrovascular events by magnetic resonance imaging. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013;62(12):1081-91.
61. Koole D, Heyligers J, Moll FL, Pasterkamp G. Intraplaque neovascularization and hemorrhage: markers for cardiovascular risk stratification and therapeutic monitoring. *Journal of cardiovascular medicine.* 2012;13(10):635-9.
62. Brinjikji W, Huston J, 3rd, Rabinstein AA, Kim GM, Lerman A, Lanzino G. Contemporary carotid imaging: from degree of stenosis to plaque vulnerability. *Journal of neurosurgery.* 2015;31:1-16.
63. Gupta A, Baradaran H, Schweitzer AD, Kamel H, Pandya A, Delgado D, et al. Carotid plaque MRI and stroke risk: a systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2013;44(11):3071-7.
64. Mani V, Muntner P, Gidding SS, Aguiar SH, El Aidi H, Weinshelbaum KB, et al. Cardiovascular magnetic resonance parameters of atherosclerotic plaque burden improve

discrimination of prior major adverse cardiovascular events. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2009;11:10.

65. Silvera SS, Aidi HE, Rudd JH, Mani V, Yang L, Farkouh M, et al. Multimodality imaging of atherosclerotic plaque activity and composition using FDG-PET/CT and MRI in carotid and femoral arteries. *Atherosclerosis.* 2009;207(1):139-43.

66. Rudd JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Pinto CA, Tong C, et al. Atherosclerosis inflammation imaging with 18F-FDG PET: carotid, iliac, and femoral uptake reproducibility, quantification methods, and recommendations. *J Nucl Med.* 2008;49(6):871-8.

67. Kim HJ, Oh M, Moon DH, Yu KH, Kwon SU, Kim JS, et al. Carotid inflammation on (1)(8)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography associates with recurrent ischemic lesions. *Journal of the neurological sciences.* 2014;347(1-2):242-5.

68. Moustafa RR, Izquierdo-Garcia D, Fryer TD, Graves MJ, Rudd JH, 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;3(5):536-41.

69. Kim S, Lee S, Kim JB, Na JO, Choi CU, Lim HE, et al. Concurrent Carotid Inflammation in Acute Coronary Syndrome as Assessed by F-FDG PET/CT: A Possible Mechanistic Link for Ischemic Stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases.* En prensa 2015.

70. 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;65(8):846-55.

71. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989;2(8669):941-4.

72. Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*. 1990;82(3 Suppl):Ii38-46.
73. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(8 Suppl):C13-8.
74. 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;364(3):226-35.
75. Dohi T, Mintz GS, McPherson JA, de Bruyne B, Farhat NZ, Lansky AJ, et al. Non-fibroatheroma lesion phenotype and long-term clinical outcomes: a substudy analysis from the PROSPECT study. *JACC Cardiovascular imaging*. 2013;6(8):908-16.
76. Calvert PA, Obaid DR, O'Sullivan M, Shapiro LM, McNab D, Densem CG, et al. Association between IVUS findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) Study. *JACC Cardiovascular imaging*. 2011;4(8):894-901.
77. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1):49-57.
78. Otsuka K, Fukuda S, Tanaka A, Nakanishi K, Taguchi H, Yoshikawa J, et al. Napkin-ring sign on coronary CT angiography for the prediction of acute coronary syndrome. *JACC Cardiovascular imaging*. 2013;6(4):448-57.
79. Hellings WE, Peeters W, Moll FL, Piers SR, van Setten J, Van der Spek PJ, et al. Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study. *Circulation*. 2010;121(17):1941-50.

80. Tian J, Dauerman H, Toma C, Samady H, Itoh T, Kuramitsu S, et al. Prevalence and characteristics of TCFA and degree of coronary artery stenosis: an OCT, IVUS, and angiographic study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64(7):672-80.
81. Xie Y, Mintz GS, Yang J, Doi H, Iniguez A, Dangas GD, et al. Clinical outcome of nonculprit plaque ruptures in patients with acute coronary syndrome in the PROSPECT study. *JACC Cardiovascular imaging*. 2014;7(4):397-405.
82. Tian J, Ren X, Vergallo R, Xing L, Yu H, Jia H, et al. Distinct morphological features of ruptured culprit plaque for acute coronary events compared to those with silent rupture and thin-cap fibroatheroma: a combined optical coherence tomography and intravascular ultrasound study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(21):2209-16.
83. Shimamura K, Ino Y, Kubo T, Nishiguchi T, Tanimoto T, Ozaki Y, et al. Difference of ruptured plaque morphology between asymptomatic coronary artery disease and non-ST elevation acute coronary syndrome patients: an optical coherence tomography study. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):532-7.
84. Takano M, Inami S, Ishibashi F, Okamatsu K, Seimiya K, Ohba T, et al. Angioscopic follow-up study of coronary ruptured plaques in nonculprit lesions. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(5):652-8.
85. Cheruvu PK, Finn AV, Gardner C, Caplan J, Goldstein J, Stone GW, et al. Frequency and distribution of thin-cap fibroatheroma and ruptured plaques in human coronary arteries: a pathologic study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(10):940-9.
86. Arbab-Zadeh A, Nakano M, Virmani R, Fuster V. Acute coronary events. *Circulation*. 2012;125(9):1147-56.

87. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997;96(5):1432-7.
88. Spence JD, Eliasziw M, DiCicco M, Hackam DG, Galil R, Lohmann T. Carotid plaque area: a tool for targeting and evaluating vascular preventive therapy. *Stroke*. 2002;33(12):2916-22.
89. Gepner AD, Young R, Delaney JA, Tattersall MC, Blaha MJ, Post WS, et al. Comparison of coronary artery calcium presence, carotid plaque presence, and carotid intima-media thickness for cardiovascular disease prediction in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015;8(1):e0022662.
90. Bild DE, Bluemke DA, Burke GL, Detrano R, Diez Roux AV, Folsom AR, et al. Multi-ethnic study of atherosclerosis: objectives and design. *Am J Epidemiol*. 2002;156(9):871-81.
91. Budoff MJ, Hokanson JE, Nasir K, Shaw LJ, Kinney GL, Chow D, et al. Progression of coronary artery calcium predicts all-cause mortality. *JACC Cardiovascular imaging*. 2010;3(12):1229-36.
92. The Atherosclerosis Risk in Communities Study: design and objectives. *Am J Epidemiol*. 2002;156:871-81.
93. van der Meer IM, Bots ML, Hofman A, del Sol AI, van der Kuip DA, Witteman JC. Predictive value of noninvasive measures of atherosclerosis for incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2004;109(9):1089-94.
94. Fernandez-Ortiz A, Jimenez-Borreguero LJ, Penalvo JL, Ordovas JM, Moco-roa A, Fernandez-Friera L, et al. The Progression and Early detection of Subclinical Atherosclerosis (PESA) study: rationale and design. *Am Heart J*. 2013;166(6):990-8.

95. Fernandez-Friera L, Penalvo JL, Fernandez-Ortiz A, Ibanez B, Lopez-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.
96. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2005;18(12):1440-63.
97. Delcker A, Diener HC. Quantification of atherosclerotic plaques in carotid arteries by three-dimensional ultrasound. *The British journal of radiology*. 1994;67(799):672-8.
98. Wannarong T, Parraga G, Buchanan D, Fenster A, House AA, Hackam DG, et al. Progression of carotid plaque volume predicts cardiovascular events. *Stroke*. 2013;44(7):1859-65.
99. van Engelen A, Wannarong T, Parraga G, Niessen WJ, Fenster A, Spence JD, et al. Three-dimensional carotid ultrasound plaque texture predicts vascular events. *Stroke*. 2014;45(9):2695-701.
100. Muntendam P, McCall C, Sanz J, Falk E, Fuster V. The BioImage Study: novel approaches to risk assessment in the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease--study design and objectives. *Am Heart J*. 2010;160(1):49-57 e1.
101. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(11):1065-74.

102. Naqvi TZ. Quantifying atherosclerosis by "3D" ultrasound works!: But there is work to be done. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(11):1075-7.

103. Vedanthan R, Choi BG, Baber U, Narula J, Fuster V. Bioimaging and subclinical cardiovascular disease in low- and middle-income countries. *Journal of cardiovascular translational research*. 2014;7(8):701-10.

104. Landry A, Fenster A. Theoretical and experimental quantification of carotid plaque volume measurements made by three-dimensional ultrasound using test phantoms. *Medical physics*. 2002;29(10):2319-27.

105. Ludwig M, Zielinski T, Schremmer D, Stumpe KO. Reproducibility of 3-dimensional ultrasound readings of volume of carotid atherosclerotic plaque. *Cardiovascular ultrasound*. 2008;6:42.

106. Landry A, Spence JD, Fenster A. Measurement of carotid plaque volume by 3-dimensional ultrasound. *Stroke*. 2004;35(4):864-9.

107. Fenster A, Blake C, Gyacskov I, Landry A, Spence JD. 3D ultrasound analysis of carotid plaque volume and surface morphology. *Ultrasonics*. 2006;44 (Suppl 1):e153-7.

108. Fenster A, Parraga G, Bax J. Three-dimensional ultrasound scanning. *Interface focus*. 2011;1(4):503-19.

109. Johri AM, Chitty DW, Matangi M, Malik P, Mousavi P, Day A, et al. Can carotid bulb plaque assessment rule out significant coronary artery disease? A comparison of plaque

quantification by two- and three-dimensional ultrasound. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2013;26(1):86-95.

110. AlMuhanna K, Hossain MM, Zhao L, Fischell J, Kowalewski G, Dux M, et al. Carotid plaque morphometric assessment with three-dimensional ultrasound imaging. *J Vasc Surg.* 2015;61(3):690-7.

111. Kalashyan H, Shuaib A, Gibson PH, Romanchuk H, Saqqur M, Khan K, et al. Single sweep three-dimensional carotid ultrasound: reproducibility in plaque and artery volume measurements. *Atherosclerosis.* 2014;232(2):397-402.

112. Johri AM, Spence JD. Barometer in the storm--carotid artery plaque quantified by three-dimensional ultrasound. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2013;26(8):A20.

113. Casasnovas JA, Alcaide V, Civeira F, Guallar E, Ibanez B, Borreguero JJ, et al. Aragon workers' health study--design and cohort description. *BMC cardiovascular disorders.* 2012;12:45.

114. Gariépy J, Massonneau M, Levenson J, Heudes D, Simon A. Evidence for in vivo carotid and femoral wall thickening in human hypertension. *Groupe de Prevention Cardiovasculaire en Medecine du Travail. Hypertension.* 1993;22(1):111-8.

115. Madsen EL, Song C, Frank GR. Low-echo sphere phantoms and methods for assessing imaging performance of medical ultrasound scanners. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40(7):1697-717.

116. Giannarelli C, Ibanez B, Cimmino G, Garcia Ruiz JM, Fata F, Bianchini E, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging detects intraplaque neovascularization in an experimental model of atherosclerosis. *JACC Cardiovascular imaging.* 2010;3(12):1256-64.

117. 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-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(11):1104-9.
118. Choi BG, Vilahur G, Zafar MU, Cardoso L, Yadegar D, Ibanez B, et al. Selective estrogen receptor modulation influences atherosclerotic plaque composition in a rabbit menopause model. *Atherosclerosis*. 2008;201(1):76-84.
119. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(4):1149-54.
120. Fuster JJ, Castillo AI, Zaragoza C, Ibanez B, Andres V. Animal models of atherosclerosis. *Progress in molecular biology and translational science*. 2012;105:1-23.
121. Ibanez B, Cimmino G, Benezet-Mazuecos J, Santos-Gallego CG, Pinero A, Prat-Gonzalez S, et al. Quantification of serial changes in plaque burden using multi-detector computed tomography in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;202(1):185-91.
122. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología*. 2013;13(Supl.E):3-12.
123. Becker F. The value of the Planiol and Pourcelot resistance index in the common carotid artery in narrow stenosis at the origin of the internal carotid artery. *J Mal Vasc*. 1982;7(3):229-31.
124. Gosling RG, King DH. Arterial assessment by Doppler-shift ultrasound. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1974;67(6 Pt 1):447-9.

125. Makris GC, Lavidia A, Griffin M, Geroulakos G, Nicolaidis AN. Three-dimensional ultrasound imaging for the evaluation of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):377-83.
126. Egger M, Spence JD, Fenster A, Parraga G. Validation of 3D ultrasound vessel wall volume: an imaging phenotype of carotid atherosclerosis. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(6):905-14.
127. Bar M, Roubec M, Farana R, Licev L, Tomaskova H, Skoloudik D. Inter-rater reliability of carotid atherosclerotic plaque quantification by 3-dimensional sonography. *Journal of ultrasound in medicine* 2014;33(7):1273-8.
128. Chiu B, Shamdasani V, Entekin R, Yuan C, Kerwin WS. Characterization of carotid plaques on 3-dimensional ultrasound imaging by registration with multicontrast magnetic resonance imaging. *Journal of ultrasound in medicine* 2012;31(10):1567-80.
129. Boonstra H, Oosterhuis JW, Oosterhuis AM, Fleuren GJ. Cervical tissue shrinkage by formaldehyde fixation, paraffin wax embedding, section cutting and mounting. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1983;402(2):195-201.
130. Reimer SB, Seguin B, DeCock HE, Walsh PJ, Kass PH. Evaluation of the effect of routine histologic processing on the size of skin samples obtained from dogs. *American journal of veterinary research*. 2005;66(3):500-5.
131. Iwadare T, Mori H, Ishiguro K, Takeishi M. Dimensional changes of tissues in the course of processing. *Journal of microscopy*. 1984;136(Pt 3):323-7.
132. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 1985;5(2 Pt 1):342-6.

133. Dobrin PB. Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings. *The Journal of surgical research*. 1996;61(2):413-5.

134. Choy JS, Mathieu-Costello O, Kassab GS. The effect of fixation and histological preparation on coronary artery dimensions. *Annals of biomedical engineering*. 2005;33(8):1027-33.

135. Yazici B, Erdogmus B, Tugay A. Cerebral blood flow measurements of the extracranial carotid and vertebral arteries with Doppler ultrasonography in healthy adults. *Diagn Interv Radiol*. 2005;11(4):195-8.

136. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(10):1018-31.

137. Ainsworth CD, Blake CC, Tamayo A, Beletsky V, Fenster A, Spence JD. 3D ultrasound measurement of change in carotid plaque volume: a tool for rapid evaluation of new therapies. *Stroke*. 2005;36(9):1904-9.