

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA.



Papel del grosor íntima-media en carótida y del TC de coronarias en la detección temprana de aterosclerosis en la mujer y posible modulación por polimorfismos relacionados con la acción estrogénica

Presentado por:

Antonio Jorge Cano Marquina

Dirigida por:

Prof. D. Antonio Cano Sánchez

Dra. Alicia Maceira González

Dr. Juan Cosín Sales

Valencia, 2016

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida del proyecto que lleva el mismo título, y que ha sido concedido en la convocatoria de 2008 de la Fundación Grupo ERESA (Proyectos de investigación Fundación Grupo ERESA) al Prof. Antonio Cano Sánchez.

Se ha llevado a cabo en los siguientes centros:

- Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la facultad de Medicina de la Universitat de València,
Av. Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia

- Servicio de Ginecología y Obstetricia,
Hospital Clínico Universitario,
Av. Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia.

- Servicio de Radiodiagnóstico -ERESA,
Hospital General Universitario.
Av. Tres Cruces 2, 46014 Valencia.



**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA
Y GINECOLOGÍA.**

Prof. **D. Antonio Cano Sánchez**, Catedrático del Departamento de pediatría, obstetricia y ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Doctora Alicia M. Maceira González, médico especialista en cardiología en Exploraciones Radiológicas Especiales Sociedad Anónima (ERESA).

Doctor Juan Cosín Sales, médico especialista en cardiología del hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Don Antonio Jorge Cano Marquina, Licenciado en Medicina por la Universidad de Valencia y especialista en radiodiagnóstico, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

Papel del grosor íntima-media en carótida y del TC de coronarias en la detección temprana de aterosclerosis en la mujer y posible modulación por polimorfismos relacionados con la acción estrogénica.

Para la obtención del título de Doctor

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a de de 2016

Fdo. Prof. D. Antonio Cano Sánchez

Fdo. Dra Alicia M. Maceira González

Fdo.Dr. Juan Cosín Sales

AGRADECIMIENTOS

Probablemente este sea uno de los apartados más difíciles de escribir sin cometer ningún olvido. Hay tanta gente detrás de un proyecto de investigación que cuando uno cree haber pensado en todos, siempre aparece alguien que no has incluido pero que ha tenido una parte capital en la consecución del mismo. Por tanto, si me olvido de alguien, espero que me lo sepa perdonar y no interprete que no estoy agradecido.

Para empezar me gustaría agradecer a mi familia. A mi madre por su insistencia en que tenía que acabar la tesis. Mi padre por haberme dado esta oportunidad y la paciencia de haberme sufrido como hijo y pupilo (no sé cuál requiere más paciencia). Por supuesto a mi hermano, que con sus escasas pero significativas visitas de fin de semana y charlas en la “staff room” han hecho esto posible. Y no me olvido de Rebeca García, mi mujer. Ha sido un constante apoyo, muy paciente y me ha ayudado cuando parecía que el procesador de textos iba a poder conmigo y acabar con las posibilidades de estar ante el tribunal en este momento.

Por supuesto a mis directores Juan y Alicia, que han sacado tiempo para corregir y recorrer cada apartado las veces que ha sido necesario sin poner ningún tipo de problema.

A Juanjo y Miguel Ángel. Sin vosotros la estadística y los polimorfismos habrían sido una tarea hercúlea.

Y a tanta otra gente que probablemente no estoy nombrando por no extenderme demasiado. Sin vosotros esto no sería una realidad.

A TODOS, ¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Enfermedad cardiovascular.....	9
2.1.1 Riesgo cardiovascular en mujeres.....	10
2.1.1.1 Enfermedad cardiovascular.....	10
2.1.1.2 Enfermedad coronaria	11
2.1.1.3 Enfermedad cardiovascular en la mujer	12
2.2 Proceso aterosclerótico.....	16
2.2.1 La pared vascular como órgano vivo.....	16
2.2.2 Endotelio vascular y aterosclerosis	17
2.2.3 Etapas de la lesión ateromatosa	17
2.2.4 Papel de la hemostasia.....	20
2.2.5 Enfermedad cerebrovascular (ictus).....	21
2.2.6 Medicina predictiva en enfermedad cardiovascular. Factores de riesgo y biomarcadores.....	22
2.2.6.1 Factores de riesgo	23
2.2.6.1.1 Factores de riesgo de enfermedad coronaria.....	23
2.2.6.1.2 Factores de riesgo de ictus.....	24
2.2.6.2 Biomarcadores	25
2.3 Ecografía de la arteria carótida, medición del grosor íntima-media (GIM).....	26
2.3.1 Ultrasonidos en medicina.....	26
2.3.2 Medición de GIM en carótida.....	28
2.4 Cardiotomografía computerizada	32
2.4.1 Consideraciones técnicas	32
2.4.2 Experiencia clínica	33
2.4.2.1 Experiencia clínica en mujeres	35

3. OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVOS:.....	41
3.1.1 Objetivo principal.....	41
3.1.2 Otros objetivos.....	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1 Materiales	45
4.1.1 Comité de ética	45
4.1.2 Participantes.....	45
4.2 Métodos.....	48
4.2.1 Medición en suero de hormonas y de bioquímica básica.....	48
4.3 Grosor Íntima-Media carotídeo	51
4.3.1.1 Región anatómica.....	51
4.3.2 Características del ecógrafo	52
4.3.3 Técnica.....	54
4.4 Cardiotomografía computerizada	56
4.4.1 Región anatómica.....	56
4.4.2 Características técnicas de la cardiotomografía computerizada	58
4.4.3 Sistemática de la exploración.....	58
4.4.3.1 Electrocardiograma (ECG) y colocación de electrodos	58
4.4.3.2 Parámetros de adquisición.....	60
4.4.3.3 Reconstrucción de la imagen y posterior lectura.....	60
4.5 Genotipado.....	63
4.5.1 Obtención de ADN.....	64
4.6 Análisis estadístico de los resultados.....	65
5. RESULTADOS	67
5.1 Descripción de la muestra.....	69

5.2	Datos clínicos y analíticos.....	75
5.3	GIM de carótida.....	76
5.3.1	GIM de carótida frente a edad	76
5.3.2	GIM de carótida frente a años desde la menopausia	78
5.3.3	GIM de carótida frente a perímetro de cintura	79
5.3.4	GIM de carótida frente a proteína C reactiva	80
5.3.5	GIM de carótida frente a glucosa	81
5.3.6	GIM de carótida frente a insulina.....	82
5.3.7	GIM de carótida frente a estradiol.....	83
5.4	GIM de bulbo carotídeo	85
5.4.1	GIM de bulbo carotídeo frente a edad.....	85
5.4.2	GIM de bulbo frente a años desde la menopausia	87
5.4.3	GIM de bulbo frente a niveles de estradiol.....	88
5.5	Resumen del resultado estadísticamente significativo del GIM en carótida y bulbo carotídeo	89
5.6	Presencia de placa ateromatosa	90
5.6.1	Placa calcificada frente a edad	90
5.6.2	Placa calcificada frente a perímetro de cintura	91
5.6.3	Placa calcificada frente a niveles de estradiol.....	92
5.7	Resultados de CTC.....	93
5.7.1	Score de calcio coronario	93
5.7.2	AngioTC de coronarias	93
5.8	Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs).....	97
5.8.1	Receptores estrogénicos beta (rs4986938)	97
5.8.1.1	rs4986938 frente a GIM de carótida derecha	97
5.8.2	Receptores Vitamina D (rs11568820)	98
5.8.2.1	rs11568820 frente a GIM de carótida izquierda	98

6. DISCUSIÓN	99
6.1 Consideraciones metodológicas.....	103
6.2 Valoración del GIM y de la presencia de placa calcificada en carótidas y bulbo:.....	105
6.2.1 Edad.....	105
6.2.2 Estrógenos.....	108
6.2.3 Perímetro de cintura	110
6.2.4 Glucemia e insulinemia	111
6.2.5 Marcadores de inflamación (PCR ultrasensible)	112
6.2.6 Vitamina D.....	113
6.3 Cardiotomografía computerizada (score de calcio y angioTC coronario).....	115
7. CONCLUSIÓN	117
8. BIBLIOGRAFÍA	121
9. ANEXOS	141
9.1 Acrónimos y Abreviaturas	143

ÍNDICE DE TABLA

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales causas de muerte de la población española. 9

Tabla 2. Factores de Riesgo de la Enfermedad Cardiovascular..... 24

3. OBJETIVOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3. Parámetros de adquisición y medio de contraste. 60

Tabla 4. Estratificación del riesgo de evento cardíaco según el resultado del CACS.....62

5. RESULTADOS

Tabla 5. Número de Gestaciones de los sujetos incluidos. 70

Tabla 6. Proporción de pacientes con HTA y Fumadoras..... 72

Tabla 7. Medias y sus desviaciones estándar de los datos analíticos y cuantitativos estudiados. 75

Tabla 8. Resumen de las variables que de forma independiente mostraron impacto GIM en las distintas zonas anatómicas. 89

Tabla 9.Resultados de las Mujeres en el CACS..... 93

Tabla 10. Estenosis estudiada mediante AngioTC Coronario (% estenosis en cualquier coronaria). 93

Tabla 11. Comparativa de los dos gráficas anteriores. 95

Tabla 12. Reclasificación de las pacientes en función de la prueba utilizada..... 95

Tabla 13. Resultados de las pacientes con algún tipo de riesgo en alguna de las pruebas que presentaban resultados para las 4 áreas a estudio. 96

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIÓN

8. BIBLIOGRAFÍA

9. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Evolución de la enfermedad coronaria	12
Figura 2. Arteria coronaria derecha distal con importante aterosclerosis, teñida con tricrómico de Masson	16
Figura 3. Evolución de la lesión ateromatosa.....	19
Figura 4. Ictus isquémico vs. Hemorrágico.....	22
Figura 5. GIM carotídeo.....	28

3. OBJETIVOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 6. Región anatómica estudiada donde se objetivan ambas arterias carótidas comunes.....	52
Figura 7. Ecógrafo Philips HD-11 XE.....	53
Figura 8. Sonda lineal L12-5 de alta frecuencia de 12 MHz.....	53
Figura 9. Región estudiada de la arteria carótida común.....	55
Figura 10. Anatomía de las arterias coronarias.....	56
Figura 11. TC General Electrics LightSpeed 64X.....	58
Figura 12. Alternativas para la colocación de los electrodos. (116)	59
Figura 13. Ejemplo de Genotipado.....	63

5. RESULTADOS

Figura 14. Distribución en grupos de edad de las pacientes a estudio.....	69
Figura 15. Proporción de la muestra en relación al IMC.....	70
Figura 16. Distribución del Perímetro de la Cintura de las Mujeres estudiadas.....	71

Figura 17. Distribución en de las Mujeres en función de sus niveles de Vitamina D.....	73
Figura 18. Distribución en de las Mujeres en función del riesgo de evento cardiovascular según RUTH.	74
Figura 19. Estudio del GIM carotídeo bilateral frente a edad....	77
Figura 20. Estudio del GIM carotídeo izquierdo frente a años desde la menopausia.....	78
Figura 21. Asociación de GIM carotídeo izquierdo con perímetro cintura.	79
Figura 22. Estudio del GIM carotídeo derecho frente a PCR.....	80
Figura 23. Estudio del GIM carotídeo izquierdo versus Glucosa sérica.	81
Figura 24. Estudio del GIM carotídeo izquierdo versus insulina sérica.	82
Figura 25. Estudio del GIM carotídeo izquierdo frente a estradiol.	83
Figura 26. Estudio del GIM carotídeo derecho frente a estradiol.	84
Figura 27. Estudio del GIM de bulbo bilateral frenete a edad.	86
Figura 28. Estudio del GIM del bulbo izquierdo frente a años desde la menorpausia.	87
Figura 29. Estudio del GIM del bulbo derecho frente a niveles circulantes de estradiol.	88
Figura 30. Presencia de placa calcificada en función de los grupos de edad.....	90
Figura 31. Presencia de placa calcificada en función del perímetro de la cintura.....	91

Figura 32. Presencia de placa calcificada en función de los niveles de estradiol..... 92

Figura 33. Prevalencia de lesiones coronarias tras el AngioTC. ... 94

Figura 34. Representación de la variabilidad alélica en relación al GIM de la carótida derecha. 97

Figura 35. Representación de la variabilidad alélica en relación al GIM de la carótida izquierda. 98

6. DISCUSIÓN

Figura 36. Mecanorreceptores y señalización intracelular del endotelio arterial. Representación esquemática de una variedad de moléculas asociadas a la membrana y a los microdominios que se cree que afectan al endotelio, convirtiendo señales mecánicas en químicas 107

7. CONCLUSIÓN

8. BIBLIOGRAFÍA

9. ANEXOS

1. RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es una de las primeras causas de muerte . Su fundamento biológico es la aterosclerosis, un proceso inflamatorio. Una parte de la lucha contra ella se ha centrado en la actuación sobre los factores de riesgo modificables. Paralelamente, hay un interés creciente en la detección de biomarcadores fiables, que sean capaces de identificar la presencia de aterosclerosis en fases tempranas, cuando el riesgo clínico es bajo. Las pruebas de imagen están siendo importantes en este contexto. Aunque ha sido tradicionalmente asociada con el género masculino, la enfermedad cardiovascular también representa la principal causa de morbi-mortalidad en las mujeres. De hecho, cualquier evento cardiovascular en mujeres a partir de la sexta década de vida presenta un peor pronóstico que en varones. Este periodo coincide con una edad en la que la mayor parte de las mujeres atraviesan la menopausia, donde se producen cambios con potencial impacto en el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Este estudio se diseñó como una evaluación cruzada en la que se trabajó con una cohorte de mujeres postmenopáusicas de la población general. Se les invitó a participar con motivo de las visitas de controles de salud en el Hospital Clínico de Valencia. Se les estudió parámetros clínicos y analíticos donde se incluyó bioquímica general, hormonas y genotipado de determinados genes a partir de ADN extraído de células sanguíneas. Estos parámetros fueron contrastados con biomarcadores de imagen de aterosclerosis. Concretamente, ecografía de bulbo y carótida común (Philips HD-11 XE) y cardiotomografía computerizada (GE LightSpeed 64X). A nivel del territorio carotídeo se evaluó el grosor

Íntima-media y la presencia o no de placa, y en arterias coronarias se estudió la presencia de calcio y de placa ateromatosa.

Para el análisis estadístico de los resultados se procedió a la aplicación de un modelo lineal general de análisis de la varianza multivariante con un nivel de significancia $P \leq 0.05$.

En cuanto al estudio ecográfico en carótida, la edad emergió como la variable independiente más potente en la variación del grosor íntima-media, con impacto en las 4 regiones anatómicas estudiadas. Los niveles de estradiol se comportaron como una variable independiente con impacto en 3 de las 4 regiones (salvo en el bulbo izquierdo). Estas dos variables reprodujeron su responsabilidad al evaluar la presencia o no de placa de ateroma. Otras variables que mostraron resultados estadísticamente significativos con alguna de las regiones anatómicas fueron los niveles de insulina, glucemia, PCR ultrasensible y el perímetro de cintura (que también presentó resultados estadísticamente significativos con la presencia de placa).

La cardiografía computerizada consiguió una reclasificación de 6 mujeres, que subieron o bajaron escalones de riesgo entre Bajo-Moderado-Muy Alto.

El estudio de genotipado mostró que los polimorfismos de nucleótido simple mostraron asociación estadísticamente significativa con el grosor íntima-media de carótida derecha para receptores estrogénicos beta y con el grosor íntima-media de carótida izquierda para los receptores de vitamina D.

En el caso del estudio ecográfico, la edad tiene especial interés por tratarse de un hallazgo ampliamente descrito en la literatura, otorgando consistencia a los resultados obtenidos. El impacto de los estrógenos sobre el grosor íntima-media se confirmó tanto por la asociación estadística encontrada con sus niveles circulantes como con sus variantes polimórficas en el caso del receptor beta. Estos datos son acordes con otros estudios, aunque estos se centran sobre todo en aportación de estrógenos exógenos.

En cuanto a las asociaciones con perímetro de la cintura y los niveles de insulina-glucemia, los hallazgos son acordes a los de otros investigadores que han encontrado modulación con los cambios hormonales. En igual sentido, la PCR ultrasensible, que es un marcador de inflamación, confirmó su potencial de monitorización de la aterosclerosis. Finalmente, los datos sobre vitamina D se añaden a la polémica sobre su efecto protector o perjudicial sobre la función endotelial.

Globalmente, los resultados de este estudio confirman asociaciones descritas en la literatura, y añaden como novedad de alto valor el impacto de los niveles estrogénicos endógenos, que mostraron significación en su versión de concentración en suero y en la sensibilidad tisular, a tenor de datos genómicos de la isoforma beta del receptor. Adicionalmente, el estudio presenta datos de cardiografía computerizada, que se suman a los de evaluación de carótida y presentan en conjunto un acercamiento exhaustivo a las variables potencialmente relevantes en el desarrollo de aterosclerosis en la mujer.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) es de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en hombres y mujeres en nuestro medio (1, 2) (Tabla 1). La lucha contra esta patología, basada en la acción contra los factores de riesgo, está obteniendo beneficios destacables. Siendo esto importante, no lo es menos el papel del diagnóstico temprano, donde los avances en la tecnología de imagen tienen un papel decisivo. Entre estos avances se encuentra la posibilidad de identificar lesiones en la pared vascular antes de la aparición de episodios clínicos. La evaluación de estas lesiones está abriendo un campo de grandes expectativas para el diagnóstico temprano y la reducción del riesgo. Estos descubrimientos ofrecen, además, la posibilidad de investigar la fisiopatología de la ECV en las mujeres y, particularmente, conocer mejor los detalles de la posible acción de las hormonas sexuales.

Defunciones según las causas de muerte más frecuentes.

Unidades: % total de muertes

	2008	
	Varones	Mujeres
Enfermedades del sistema circulatorio	27,9	35,9
Tumores	32,2	21,2
Enfermedades del sistema respiratorio	12,7	10,0
Enfermedades del sistema digestivo	5,2	4,9
Enfermedades del sistema nervioso y de los órganos de los sentidos	3,4	5,7
Causas externas de mortalidad	5,3	2,6
Trastornos mentales y del comportamiento	2,1	4,4
Otras causas	11,1	15,0

Fuente: Defunciones según la causa de muerte. INE

Tabla 1. Principales causas de muerte de la población española.

En esta sección se introducen los elementos principales que se han tenido en consideración para la elaboración de este estudio, así como el procedimiento de obtención de resultados. Está dividida en tres apartados principales, que atañen a la fisiopatología de la ECV, con enfoque especial sobre la mujer, y a las dos técnicas de imagen empleadas, la ecografía carotídea y la cardiotomografía computerizada.

2.1.1 Riesgo cardiovascular en mujeres

2.1.1.1 Enfermedad cardiovascular

La ECV en sí misma es una denominación amplia, que incluye patologías del árbol arterial como la enfermedad coronaria (EC), la enfermedad cerebrovascular o ictus y la enfermedad vascular periférica, y patologías venosas como la trombosis venosa (TV).

El fundamento de la ECV arterial es la aterosclerosis, proceso inflamatorio que forma placas en distintos puntos del árbol arterial. Cursa de forma asintomática a lo largo de décadas, durante las cuales las placas de ateroma van evolucionando. Si llegan a romperse, pueden generar un evento aterotrombótico agudo o, en caso de seguir creciendo, causar una obstrucción vascular crónica.

La enfermedad cardiovascular en su conjunto constituye la primera causa de muerte tanto en hombres como en mujeres en España y Europa. De las dos formas anteriormente mencionadas (EC e ictus), la EC constituye la primera causa de muerte en los varones y su incidencia está aumentando en mujeres (1-3). No obstante, cabe mencionar que, en el área mediterránea, la prevalencia del ictus todavía es mayor que la de EC en el género femenino

(4). Considerando diferencias regionales a escala mundial, la EC es la primera causa de mortalidad en hombres y mujeres en la Unión Europea (5) y, de forma aún más clara, esta situación se repite en Estados Unidos, donde el ictus queda mucho más alejado de la EC en cuanto a incidencia y mortalidad (6).

2.1.1.2 Enfermedad coronaria

La EC se produce como consecuencia de una estenosis u obstrucción, crónica o aguda, en un punto determinado de las arterias coronarias que, en consecuencia, genera un proceso isquémico distal. La arteria afectada, el punto de la obstrucción más o menos distal, y el grado de estenosis son los factores que determinan la extensión del territorio afectado y, por tanto, la gravedad de la lesión. Independientemente de la arteria coronaria afectada, una disminución del 50% de la luz del vaso se considera estenosis significativa, y si la estenosis supera el 70%, se considera ya subsidiaria de tratamiento (7), aunque se considerará estenosis crítica cuando obstruya el 90-95% de la luz arterial.

En la fisiopatología de la EC hay dos componentes fundamentales, la biología de la pared arterial y la hemostasia. Esta última define el conjunto de mecanismos biológicos que se encargan de mantener la fluidez de la sangre en el árbol vascular y a la vez de impedir la pérdida de sangre a través de soluciones de continuidad que se puedan producir en la pared de los vasos. De las dos, la que acumula mayor atención es la primera pues aunque hay una participación fundamental de la segunda en los procesos

obstructivos coronarios, es la alteración de la pared vascular la que inicia el proceso.

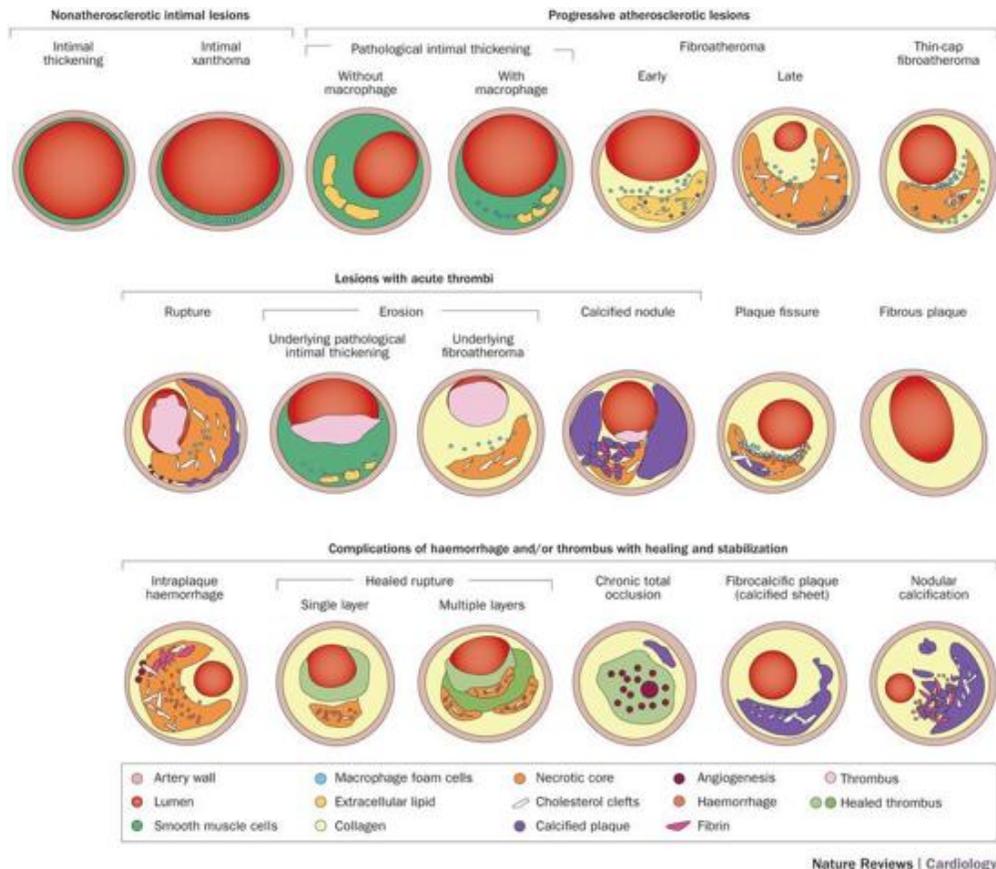


Figura 1. Evolución de la enfermedad coronaria

2.1.1.3 Enfermedad cardiovascular en la mujer

La ECV ha sido considerada tradicionalmente una enfermedad masculina. Como consecuencia de ello la investigación se ha centrado durante años en los varones, y en ellos se ha focalizado el desarrollo de programas y guías de práctica clínica, con una visión muy simplificada del riesgo en las mujeres.

Esta situación ha determinado que las propias mujeres hayan prestado menos atención a esta enfermedad, a pesar de ser la principal causa de morbilidad y mortalidad también en el género femenino (1-3).

Sin embargo, como consecuencia de factores como la mayor expectativa de vida y su creciente adherencia al hábito tabáquico, el número de muertes por ECV en las mujeres supera al de hombres desde hace ya varios años. Más aún, la probabilidad de muerte tras un infarto de miocardio se duplica en las mujeres respecto a los hombres cuando el episodio se presenta después de los 65 años. Las mujeres supervivientes presentan también más riesgo de muerte que los hombres en el primer año tras el evento, y más riesgo de recidiva en los 6 años siguientes (8). Debido a lo mencionado, la ECV tiene un pronóstico peor en el género femenino a partir de la sexta década de la vida.

Existen estudios que defienden que los estrógenos producen un aumento en los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL), lo que podría explicar la menor incidencia de esta enfermedad en mujeres premenopáusicas (9, 10). La testosterona tendría el efecto contrario, ya que disminuye los niveles de HDL de manera significativa cuando la comparamos con los estrógenos. Esto también sería compatible con la tesis de que los hombres tienen mayor riesgo cardiovascular que las mujeres premenopáusicas, pero éstas aumentan su riesgo cardiovascular tras la menopausia (11-13). De hecho, los picos de incidencia de ECV se presentan con un retraso de algunos años en las mujeres. Existen multitud de datos biológicos que apoyan un efecto protector de los estrógenos frente a la aterogénesis, alimentando la hipótesis de un efecto protector de la función hormonal ovárica, que se perdería tras la menopausia.

Los datos que tenemos sobre el efecto específico de la transición hacia la menopausia en el riesgo cardiovascular son aún escasos. Hay algunos análisis poblacionales, que han detectado cambios, si bien moderados, en factores de riesgo. Por ejemplo, el estudio SWAN (*Study of Women's Health Across the Nation*) norteamericano siguió de manera prospectiva a una cohorte multirracial de 3302 mujeres a lo largo de 10 años. De ellas, 1.054 pasaron la menopausia sin intervención de cirugía y sin recibir terapia hormonal. Se investigó sobre algunos factores de riesgo y se detectó un incremento de los niveles de colesterol total, lipoproteína de baja densidad (LDL) y apoproteína B, todos ellos claramente asociados con la transición a la menopausia (14). Datos del mismo estudio confirmaron que la menopausia se asocia también a un incremento en el índice de masa corporal, si bien la acción es leve en comparación con otros factores de riesgo como la etnicidad o el sedentarismo (15).

Junto a ello, ensayos clínicos bien diseñados y con alto número de participantes, como el estudio WHI (*Women's Health Initiative*), sugieren que la reposición de los estrógenos perdidos se asocia a una reducción de riesgo de EC, lo que es consistente con la hipótesis de protección estrogénica frente a la aterogénesis en sus fases iniciales, pero no si ya hay placas establecidas (16).

Por tanto, la aparición o empeoramiento de distintos factores de riesgo con la caída estrogénica, y la magnitud de estudios básicos y experimentales favorables a un efecto protector de los estrógenos, abogan en conjunto por la consideración de la menopausia como una estación de interés en la evaluación global del riesgo cardiovascular en las mujeres. El intervalo de tiempo mínimo necesario para la génesis de la placa de ateroma lleva a que

sea precisamente la ventana definida por los años que siguen a la transición menopáusica los que merecen especial atención, si bien esto ha sido insuficientemente explorado.

2.2 Proceso aterosclerótico

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio de la pared arterial de larga evolución(17). Presenta diversas formas según la fase evolutiva en que se encuentre, en lo que influye el continuo proceso de remodelado de la pared vascular (18).

2.2.1 La pared vascular como órgano vivo

El concepto de remodelado vascular integra el conjunto de cambios fisiopatológicos de la pared vascular que ocurren en sus tres componentes esenciales: endotelio, músculo liso y fibroblastos. Estos tres elementos interactúan de forma compleja y reaccionan generando una serie de mediadores de acción local, esencialmente factores de crecimiento y sustancias vasoactivas, que intervienen en los procesos celulares de crecimiento, migración y muerte. También actúan sobre la matriz extracelular, regulando su producción y degradación. De hecho, la aterosclerosis es una respuesta a la lesión endotelial. Esta lesión produce infiltración inflamatoria y trombosis (Figura 2).

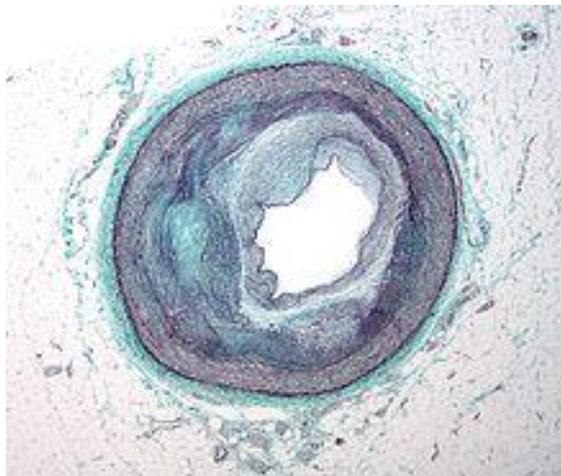


Figura 2. Arteria coronaria derecha distal con importante aterosclerosis, teñida con tricrómico de Masson (Wikipedia)

2.2.2 Endotelio vascular y aterosclerosis

El endotelio se considera un órgano endocrino, ya que genera una amplia variedad de mediadores con efecto autocrino y paracrino (19). Sus productos de secreción contribuyen a regular las respuestas inmunes, el tono vascular y la hemostasia. Por ello, las alteraciones endoteliales tienen relevancia también en otras patologías como la hipertensión arterial (HTA), la diabetes, los procesos vasculares inflamatorios y autoinmunes, la trombosis y el crecimiento tumoral; todos ellos influyen, a su vez, en la evolución de la aterosclerosis (17).

Las zonas que presentan mayor afectación de la enfermedad descrita son aquellas en las que se objetiva una mayor turbulencia del flujo sanguíneo, como las áreas de curvas pronunciadas (cayado aórtico) o en las ramificaciones vasculares (bifurcación aórtica, carotídea, etc.).

2.2.3 Etapas de la lesión ateromatosa

La progresión de la enfermedad se lleva a cabo por lesiones que siguen una serie de etapas (Figura 3). De acuerdo a la descripción clásica de Fuster, cabe distinguir tres tipos de lesión (20, 21):

- Lesión tipo I: es una alteración puramente endotelial, sin cambios morfológicos manifiestos. Fenómenos físicos como las turbulencias del flujo sanguíneo en ciertas áreas del árbol arterial, curvaturas o ramificaciones, o el aumento del estrés por cizallamiento, son suficientes para originarlas. Junto a los factores puramente mecánicos, cualquier inductor de disfunción endotelial representa un elemento amenazante. De esta forma, fenómenos

de tipo infeccioso, inmunitario, o irritativo, como el debido a los tóxicos del tabaco o la aparición de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), pueden jugar un papel inductor importante.

Las LDLox han recibido atención especial. Se trata de partículas modificadas por la oxidación, lo que les impide unirse a su receptor. Como resultado, se acumulan en el espacio subendotelial donde son fagocitadas por macrófagos, que se convierten así en células espumosas (22). Las denominadas estrías grasas de la pared son acúmulos de células espumosas. Paralelamente, los productos que se producen a partir de la peroxidación de LDL, fundamentalmente aldehidos, son tóxicos celulares altamente difusibles. Se desarrolla entonces un proceso irritativo sobre el endotelio (23).

A medida que el proceso evoluciona, las estrías grasas llegan a hacerse patentes como verdaderas placas de aterosclerosis con un interior lipídico cubierto por una capa de células musculares lisas y colágeno.

- Lesión tipo II: supone ya una grave disfunción del endotelio, con localización de la lesión a nivel de la íntima. Se acompaña de fenómenos de agregación plaquetaria y microtrombosis, consecuencia de la liberación de productos tóxicos de los macrófagos.

- Lesión tipo III: Las lesiones sobrepasan la íntima, y llegan a la media. La agregación plaquetaria, con formación y organización de trombos, unido a la proliferación de células musculares lisas, son aquí de máxima entidad. Las lesiones quedan aisladas de la luz vascular gracias a la formación de una

cubierta fibrosa. Mientras tanto, la progresión continúa a través de la adherencia de leucocitos a partir de sus márgenes laterales. Los principales factores que promueven la continua llegada de macrófagos son el factor estimulante de colonias tipo-macróforo, la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 y la LDLox.

La forma más peligrosa viene condicionada por la inestabilización de las placas, por la ruptura de la cubierta fibrosa, que activa la agregación plaquetaria y conlleva la formación de trombos con potencial de oclusión de vasos distales.

Se piensa que este proceso está en la base de al menos un 50% de los procesos coronarios agudos (24). Hay un conocimiento bastante preciso de muchas de sus características (25). La acumulación progresiva de lípidos, y la consiguiente de macrófagos, son el factor determinante, pues los segundos destruyen tejido erosionando la cubierta fibrosa desde el interior. Los macrófagos tienen capacidad para digerir la matriz extracelular por fagocitosis directa o por secreción de una serie de sustancias, donde destacan enzimas implicadas en la digestión y remodelamiento de la matriz extracelular, las llamadas metaloproteinasas. El estudio de los mecanismos de regulación de estas enzimas es uno de los campos de más interés actual en la prevención de ECV (26-29).

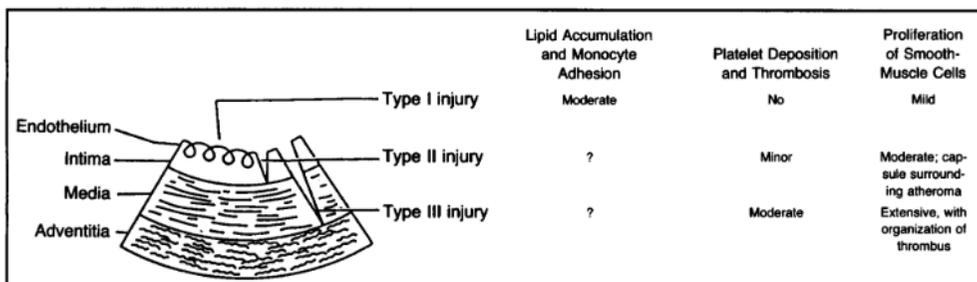


Figura 3. Evolución de la lesión ateromatosa.

2.2.4 Papel de la hemostasia

Las alteraciones de la pared vascular constituyen un factor de activación persistente de la hemostasia. Se afectan las plaquetas y también el factor tisular, inicio y estímulo de la vía extrínseca de la coagulación.

Las plaquetas son los elementos más importantes en las trombosis arteriales. A favor de ello, animales con déficit selectivo de factor de von Willebrand son resistentes a la trombosis y al desarrollo de aterosclerosis espontánea. La agregación plaquetar está regulada a nivel local por el equilibrio entre mediadores de origen endotelial, que son vasodilatadores además de antiagregantes, y los que comparten la tendencia vasoconstrictora con la proagregante. Entre los primeros cabe destacar al óxido nítrico y a la prostaciclina, aunque también es importante la trombomodulina, una molécula que se une selectivamente a la trombina, impidiendo que esta active la agregación plaquetar. Entre los segundos, hay que mencionar a la endotelina-1 (ET-1), más vasoconstrictor que proagregante, y al factor de von Willebrand, más proagregante que vasoconstrictor (30, 31).

Cuando se agregan, las plaquetas liberan gránulos ricos en mediadores como citoquinas o factores de crecimiento, que promueven la migración a la zona de monocitos/macrófagos y células musculares lisas, así como proliferación de estos tipos celulares. También tras la agregación plaquetar, se activan una serie de factores de la coagulación que acaban constituyendo un coágulo de fibrina. Tras ello, los leucocitos se acumulan sobre el trombo a fin de aportar las condiciones que lo estabilizan (32).

2.2.5 Enfermedad cerebrovascular (ictus)

Gran parte de la fisiopatología del ictus es similar a la de la EC, pues se trata de un problema vascular que en un elevado porcentaje de los casos, sobre todo a partir de los 65 años, es secundario a aterosclerosis, ya sea por una placa de ateroma que obstruye un vaso de forma aguda o por rotura de la pared vascular aterosclerótica y frágil, con hemorragia circundante. Por debajo de esta edad es más frecuente la etiología embolígena, secundaria a enfermedades sistémicas o malformativas (33-35).

Los procesos más frecuentes con que nos encontramos dentro del ictus son los accidentes isquémicos transitorios (AIT), es decir, déficits neurológicos de origen brusco que persisten menos de 24 horas. Aunque originan isquemia cerebral y síntomas, suelen resolverse sin secuelas neurológicas permanentes. Esta definición, que sigue operativa, está empezando a ser rebatida con ayuda de las modernas técnicas de imagen, resonancia magnética y tomografía de emisión de positrones fundamentalmente, que están descubriendo que muchos de los llamados AIT en realidad originan lesiones irreversibles, que tienden a ser compensadas por las áreas no dañadas, dando la falsa impresión de que se trata de una lesión meramente funcional. De esta forma, sólo cabría hablar de AIT si no hay lesión alguna detectable en el tejido cerebral, desapareciendo el concepto basado en la repercusión funcional (36).

Junto a las formas transitorias, las formas más graves son los infartos secundarios a trombosis o embolismo de arterias intracraneales, o a hemorragias por rotura de la pared vascular, bien parenquimatosas secundarias a HTA o subaracnoideas debidas a malformaciones

arteriovenosas. Surge así la división en las dos grandes formas del ictus grave, la isquémica y la hemorrágica (Figura 2.3) (37).

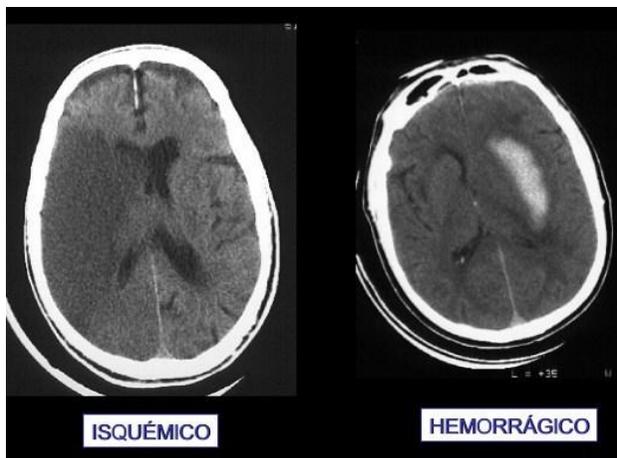


Figura 4. Ictus isquémico frente a ictus hemorrágico (www.slideshare.net)

2.2.6 Medicina predictiva en enfermedad cardiovascular. Factores de riesgo y biomarcadores

La mayoría de las enfermedades crónicas con alta carga de morbimortalidad (ECV, osteoporosis, cáncer) presentan una fase de evolución subclínica. Por eso, una estrategia generalizada en la medicina actual consiste en la identificación temprana, durante esa fase subclínica, de la lesión a fin de tratarla y evitar sus secuelas. A esta estrategia obedece la práctica de las tácticas de cribado en cáncer, con el conjunto de exploraciones que van desde la citología cervical a la mamografía, la colonoscopia, etc. Este mismo *modus operandi* se reproduce en el caso de la osteoporosis, con la práctica de densitometrías o evaluación cuantitativa de riesgo con escalas adecuadas, y también, en gran medida, en el caso de la ECV.

2.2.6.1 Factores de riesgo

Los factores de riesgo pueden ser modificables o no modificables. La importancia de los primeros radica en que admiten margen de actuación. Su impacto es grande, como demuestran las observaciones sobre las comunidades de japoneses que han nacido en Japón y desarrollan luego su vida en la costa oeste americana o en Hawaii, quienes acaban reproduciendo los patrones de enfermedad de la población que les acoge (38).

2.2.6.1.1 Factores de riesgo de enfermedad coronaria

En EC, los factores de riesgo no modificables son esencialmente edad, sexo, raza y antecedentes familiares, y los modificables, hábito tabáquico, HTA, dislipidemia y diabetes mellitus (17) (Tabla 2). Desde hace años se trabaja en la reducción de estos últimos, con buenos resultados en el descenso de las tasas de mortalidad cardiovascular en los países que los han atacado de manera persistente. El nivel de evidencia es tal que se han modificado las guías de práctica clínica en prevención primaria (39).

Más aún, a partir del análisis de los factores de riesgo se han desarrollado modelos matemáticos que tienen en cuenta el peso relativo de cada uno, a fin de conseguir una aproximación al riesgo real de un individuo determinado; a partir de ellos se han creado y validado escalas predictivas de riesgo. Estas escalas están avaladas por sociedades científicas, como la escala norteamericana de Framingham, disponible tanto para EC (<http://cvdrisk.nhlbi.nih.gov/calculator.asp>), como para ictus (<http://www.framinghamheartstudy.org/risk-functions/stroke/stroke.php>) o la escala SCORE europea (http://www.escardio.org/static_file/Escardio/

Subspecialty/EACPR/Documents/score-charts.pdf). Estas escalas se utilizan actualmente en la práctica clínica diaria y son un instrumento fundamental para el clínico.

Factores modificables	Factores no modificables
Tabaco	Edad
HTA	Sexo
Dislipemia	Raza
Diabetes Mellitus	Antecedentes Familiares/Personales

Tabla 2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular

2.2.6.1.2 Factores de riesgo de ictus

La identificación de factores de riesgo en el ictus se ha hecho con grandes dificultades en la práctica, de forma que presentan un alto nivel de incertidumbre predictiva. En la actualidad, se dividen, como para la EC, en modificables y no modificables. Los segundos son la edad avanzada, género masculino, raza negra, antecedente de EC o insuficiencia cardíaca congestiva, e historia familiar de ictus, accidentes isquémicos transitorios o fibrilación auricular (40). La diabetes es otro factor de riesgo que algunos consideran modificable y otros no. Los modificables quedan reflejados en la tabla 2 junto a los no modificables.

En un intento de ir más allá, y llegar a un sistema fiable de predicción de riesgo de ictus para un determinado individuo, un grupo de investigadores puso las bases para adaptar las herramientas ya existentes a la predicción de los accidentes cerebrovasculares (ACV). El método fue validado

independientemente (41) y, de acuerdo con él, puede llegar a estimarse el riesgo para sufrir un ictus en los siguientes 10 años, según género, para pacientes de entre 55 y 85 años que no hayan sufrido ningún episodio previo. El rango de riesgo para un determinado paciente oscila, según el índice, entre 1% y algo más del 80%.

2.2.6.2 Biomarcadores

Siendo ésta una estrategia que ha cosechado importantes éxitos, lo cierto es que es mejorable, pues hay individuos que sufren la enfermedad sin que se les hayan detectado factores de riesgo. Por ejemplo, un estudio en pacientes ingresados con el diagnóstico de EC en hospitales norteamericanos encontró que más del 75% presentaban niveles de LDL normales (< 130 mg/dL) (42). Estas observaciones presentan un desafío que ha generado el nuevo concepto de biomarcadores, es decir, de indicadores de formas subclínicas de enfermedad, que prueben de manera fehaciente que, al margen de cómo estén los factores de riesgo, la enfermedad está ya allí en distintas fases de su evolución natural.

El hecho de que la aterosclerosis sea una enfermedad inflamatoria ha llevado a un interés creciente sobre marcadores de inflamación, que en estudios clínicos han demostrado identificar riesgo con más fiabilidad que muchos de los factores de riesgo tradicionales. El argumento es claro: si la aterosclerosis resulta ser una enfermedad inflamatoria, podemos confirmar que la enfermedad existe si tenemos marcadores de inflamación suficientemente específicos.

Marcadores de inflamación hay muchos (43), y también bibliografía que los implica en la detección de riesgo. La proteína C reactiva (PCR) ultrasensible

es uno de los marcadores inflamatorios con mayor evidencia científica. Hay estudios prospectivos en mujeres demostrando que, junto al nivel de LDL en sangre, es el único marcador que de forma independiente parece capaz de predecir riesgo (44). La atención que este concepto ha creado ha sido ingente, como lo está siendo la bibliografía que está generando (45).

En este contexto, el avance de las tecnologías de imagen ha permitido detectar y medir directamente los cambios de la pared vascular e incluso la presencia y progresión de las placas ateromatosas de forma no invasiva. Esto ha planteado interrogantes sobre el impacto que ello pueda tener en la predicción de episodios clínicos. Dos técnicas han resaltado por su operatividad en este contexto, la medida del grosor de la íntima media (GIM) en carótida común por ultrasonidos y la evaluación directa en las coronarias mediante la cardiografía computerizada (CTC). A continuación se introducen los rasgos más importantes de cada una de estas técnicas radiológicas.

2.3 Ecografía de la arteria carótida, medición del grosor íntima-media

2.3.1 Ultrasonidos en medicina

Los ultrasonidos son ondas sonoras con frecuencia superior a 20kHz. En medicina se utilizan, de forma más o menos global, frecuencias entre los 2 y los 18 MHz. La utilidad es muy variada y generalmente se utiliza para el estudio de partes blandas (46-49).

Los inicios de los ultrasonidos se remontan a 1949, cuando J. Wild utilizó por vez primera este mecanismo para la valoración del grosor de la pared intestinal. Simultáneamente a todos estos descubrimientos en la aplicación médica de los ultrasonidos, en Glasgow, I. Donald utilizó el ecógrafo con objetivos obstétricos; y ya en el año 1958 se desarrolló la primera publicación en la literatura sobre el uso médico de las imágenes ecográficas: “Investigation of Abdominal Masses by Pulsed Ultrasound” en The Lancet (50). Pero no fue hasta 1963 cuando se diseñó el “ecógrafo moderno” con un brazo para la sonda.

Los elementos clave para la obtención de imágenes incluyen la producción de una onda sónica, la recepción de ecos, y finalmente, la interpretación de esos ecos. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que consigue imágenes nítidas y precisas de tejidos blandos, sobre todo aquellos en los que existe componente líquido. Al mismo tiempo, nos presenta imágenes en tiempo real, lo que nos permite también su uso como medio de guía para la toma de biopsias o manipulaciones (51, 52). Los efectos secundarios son prácticamente inexistentes y apenas causa molestias a los pacientes, siendo un elemento fácilmente transportable en caso de necesidad. A todas estas virtudes hay que añadir la nula radiación emitida y el bajo coste de la prueba.

Como desventajas, esta técnica no permite la valoración ósea, pues es un material demasiado denso, y pierde mucha calidad si hay interfases aéreas. También, se ve influenciada por la distancia del campo a valorar, por la obesidad del paciente (la grasa subcutánea atenúa la señal), y por su dependencia del operador.

2.3.2 Medición de GIM en carótida

Es un procedimiento que mide el grosor combinado de la íntima y la media en la pared arterial de la carótida. Específicamente, mide la distancia entre la interfaz luz vascular-íntima a la interfaz media-adventicia en la pared vascular.

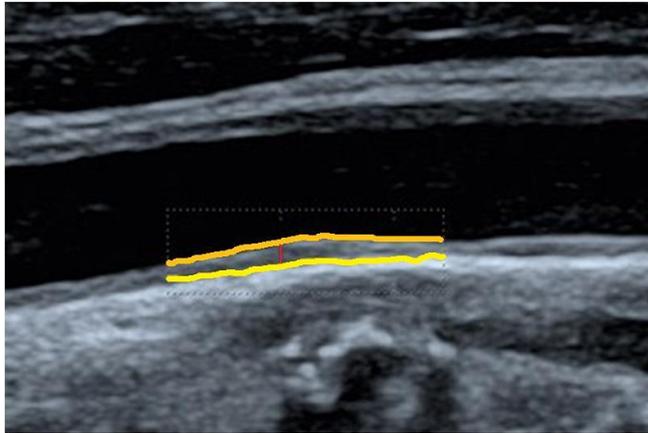


Figura 5. GIM carotídeo

Se trata de una técnica sencilla, rápida y no invasiva, tomándose un segmento de 1 cm de la arteria carótida común a aproximadamente 1 cm del bulbo (53-55). Mientras que en el caso del bulbo carotídeo, la valoración se realiza en el mismo bulbo.

La uniformidad en la región seleccionada es condición para la reproducibilidad de los parámetros de medida, al igual que la metodología de realización del estudio, para lo que se han establecido una serie de condiciones estándar acerca del equipo utilizado, la técnica de medida, y la experiencia del operador, que se recogen en las tablas de metodología publicadas por la American Society of Echocardiography (ASE) (56). Con estos requerimientos se ha consensuado que, para cualquier parámetro, los valores anormales son aquéllos que sobrepasan el percentil 75 de la

población. Se considera que el aumento en el grosor a nivel de la carótida común indica aterosclerosis difusa (57).

La técnica permite también la identificación de placas de ateroma (58). Las placas suelen ubicarse en áreas de flujo turbulento, tales como el bulbo o la carótida interna (59), y se han definido de forma variada. La American Heart Association (AHA) considera placa ateromatosa carotídea un incremento de grosor focal que supere el 50% del grosor de los segmentos circundantes (60), mientras que algunos autores han utilizado la medida de GIM igual o superior a 1.9 mm (61), o simplemente superior a 1.5 mm (53). Este parámetro correlaciona bien con la histología de la lesión (57) y aumenta con la edad, con una tasa de progresión anual de ≤ 0.03 mm. Esta progresión es un fiel reflejo del riesgo (62), y es sensible a la modificación de los factores de riesgo.

La hipótesis subyacente al uso de esta técnica era que la visualización directa de la pared arterial afectada por aterosclerosis debería ser un factor predictor potente de ECV. De hecho, el primer estudio, que se llevó a efecto sobre varones en Finlandia en 1993 (63), el *Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor study*, encontró que el riesgo de infarto de miocardio aumentaba un 11% por cada 0.1 mm de incremento en el GIM de carótida. Unos años más tarde, en 1997, el estudio *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)* encontró que cada incremento en 0.19 mm en GIM de carótida aumentaba el riesgo de muerte por infarto de miocardio en 36% (64). Curiosamente, este estudio encontró diferencias entre hombres y mujeres, con un aumento de riesgo que era 2.5 veces mayor en éstas para igual incremento

en el GIM carotídeo. Esta diferencia de género, sin embargo, no ha sido detectada en otros estudios (65).

Posteriormente el GIM ha sido incluido en distintos estudios clínicos que han evaluado su valor añadido a los factores de riesgo tradicionales en la predicción de riesgo de ictus o EC (53, 59, 66, 67), de forma que ha demostrado capacidad predictiva independiente tanto en sujetos con como sin antecedentes de ECV (68, 69). Un metaanálisis (70) confirmó su valor predictivo independiente tras corregir por otros factores de riesgo. De interés en ese análisis, el potencial predictivo era algo superior para ictus que para infarto de miocardio. Así, su introducción ha permitido la reclasificación de los individuos de riesgo intermedio a riesgo bajo o alto.

Hay también algunos estudios comparativos de GIM con la valoración de calcio en coronarias (*Coronary Artery Calcium Score*, CACS; o *Score de Calcio Coronario*, SCC) (63-65, 68, 70-73), aunque la evidencia es aún insuficiente para concluir acerca de su eventual equivalencia. En un estudio en individuos de edad superior a 70 años, ambas técnicas mostraron un perfil predictivo similar, aunque el GIM presentó una relación más potente con el ictus (63-65, 68, 70-77) mientras que el score de calcio se relacionó mejor con EC (78).

Más recientemente, el *Framingham Offspring Study Cohort* ha investigado si la incorporación de este parámetro añade o no capacidad predictiva al índice de Framingham (53). La medida de GIM tanto en la carótida común como en la carótida interna fue capaz de predecir episodios

cardiovasculares, aunque sólo la medida en carótida interna y la presencia de placa fueron capaces de mejorar la capacidad predictiva de la herramienta Framingham. El estudio ARIC por su parte, encontró que la asociación del GIM en carótida común asociado a la presencia/ausencia de placa mejoró leve, pero significativamente, el potencial predictivo de la herramienta Framingham (53, 59, 68, 69), así como la reclasificación de un 9.9% de los participantes tomando como objetivo la EC (79).

En los últimos años, se han publicado algunos trabajos en los que se concluye que el engrosamiento de la íntima-media de las carótidas no aporta datos significativos en relación a la evolución general de la aterosclerosis durante la transición menopáusica de la mujer (80). Sería la disfunción endotelial sin más, y no los cambios en GIM. Contrariamente, datos posteriores han podido confirmar cambios en GIM durante la transición menopáusica en un estudio mejor diseñado, realizado en pacientes de la cohorte SWAN (55).

En otras publicaciones que valoran el riesgo cardiovascular de mujeres postmenopáusicas, no se aborda esta técnica como mecanismo diagnóstico ni herramienta de screening, pues se centran sobre todo en los valores séricos de los lípidos (14) y el síndrome metabólico (81) como posibles factores de riesgo.

2.4 Cardiotomografía computerizada

2.4.1 Consideraciones técnicas

La cardiotomografía computerizada (CTC) es una técnica de imagen que utiliza radiación ionizante para obtener cortes anatómicos con fines diagnósticos. En esencia, el mecanismo de funcionamiento de esta herramienta se fundamenta en la emisión de radiación a un tejido. Un sistema detector valora la radiación no absorbida mientras rota alrededor del cuerpo de forma helicoidal. La reconstrucción se realiza a través de logaritmos específicos que realizan la conversión de la imagen.

Los orígenes de esta técnica diagnóstica se remontan a la década de los años 70, cuando A.M.Cormack, un ingeniero físico norteamericano, y G.N. Hounsfield, un ingeniero electrónico inglés, trabajaron para desarrollar los primeros equipos de TC, que se limitaban al estudio del cráneo (82-84). Hasta 1974 no se logró realizar una TC de cuerpo entero que permitía observar con más claridad las partes blandas. Los nuevos equipos de TC multicorte han evolucionado tanto en la realización de la exploración como en las reconstrucciones y abaratamiento del proceso. En la actualidad resulta una herramienta indispensable en cualquier hospital.

En el caso del estudio de las arterias coronarias, es recomendable disponer de un aparato de al menos 64 detectores (85). La información que suministra incluye, por un lado la valoración del calcio total coronario, y por otro lado la angiografía coronaria no invasiva (posteriormente referida como angioTC coronaria). Se dará más detalles en la sección de Material y Métodos.

Esta técnica requiere también el empleo de medio de contraste yodado, que presenta riesgo de reacciones alérgicas o problemas en pacientes con insuficiencia renal (86-88). También requiere que el paciente tenga una frecuencia cardíaca baja y regular, aunque en los equipos de última generación los requerimientos no son ya tan estrictos (89). Asimismo, el paciente debe tener capacidad de realizar una apnea de unos diez segundos aproximadamente.

La técnica proporciona un estudio detallado de la anatomía y morfología cardíaca y coronaria, así como de la función cardíaca (90) y posee una elevada especificidad para detección de EC (91), hasta del 96%. (92). Como limitaciones de la técnica, cabe destacar la utilización de radiación y de contraste potencialmente nefrotóxico y alergénico, su utilidad diagnóstica limitada cuando las coronarias están significativamente calcificadas, y su sobreestimación del grado de estenosis en los modelos más antiguos, (93, 94), aunque este aspecto ha mejorado en los equipos actuales (95).

2.4.2 Experiencia clínica

El estudio MESA (*The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*)(96) incluyó a 6814 pacientes sin enfermedad cardiovascular previa, y los siguió durante una media de 6 años. Confirmó que la puntuación del SCC era una herramienta útil en la valoración del riesgo cardiovascular, pues mejoraba la capacidad predictiva cuando se añadía a los factores de riesgo tradicionales. Hay también otros estudios en los que se sostiene que la angioTC coronaria correlaciona con otros indicadores de riesgo, sugiriéndose por tanto que es útil para la valoración de placas calcificadas y no calcificadas (97-99), aunque

se trata de estudios de menor envergadura que el estudio MESA. Además de estudios en los que se investigó el potencial de la CTC para predecir riesgo de episodios clínicos, hay estudios que han relacionado con éxito los datos con parámetros de riesgo, tales como marcadores de inflamación (100), u otros.

El aporte de la CTC ha mejorado la estratificación de pacientes llevada a efecto a partir de factores de riesgo tradicionales. Con estos y aplicando la escala de Framingham, los pacientes son habitualmente divididos en tres categorías: alto, intermedio y bajo riesgo (>10%, 3-10% y <3% respectivamente). Tomando como determinante un nivel de estenosis >50% y la medición del score de calcio con la CTC, se mejoró significativamente el posicionamiento de pacientes que estaban clasificados en los niveles de riesgo intermedio o bajo. Además, en caso de ausencia de estenosis en la angioTC coronaria, la probabilidad de padecer un episodio clínico en los siguientes 5 años era 0% en pacientes con niveles de riesgo intermedio o bajo calculado en base a una escala de factores de riesgo. Sin embargo, y esto es lo particularmente interesante, en caso de resultado positivo, el riesgo se situaba en torno al 88% y al 68% de padecer un episodio en el siguiente lustro en pacientes que, de acuerdo a las escalas de riesgo, tenían riesgo intermedio o bajo respectivamente (101).

Además, en otro estudio a partir de datos del estudio MESA, la reclasificación hacia estadios distintos a los originales (alto o bajo) afectó a un 8% de la población estudiada (102). Como se ha comentado antes, este estudio contrastó los datos de imagen con la aparición de episodios clínicos a lo largo del período de seguimiento, y no ya con otros factores de riesgo. Por ello, la CTC constituye una herramienta muy útil para la reclasificación

de los pacientes de riesgo intermedio. De acuerdo con ello, es útil para el desarrollo de estrategias farmacológicas preventivas.

Como consecuencia de estos datos, ya existen guías para la utilización del angioTC coronario en pacientes sintomáticos con riesgo bajo-intermedio (ESC 2013) y en pacientes asintomáticos de riesgo intermedio (ESC 2012). No obstante, se necesitan todavía más estudios para generalizar el uso de esta técnica (103, 104). La aparición de aparatos más rápidos y que aportan menos dosis de radiación ionizante puede reducir parte de la reserva mantenida todavía para su uso generalizado (105). También a favor de ello, datos de otros estudios apoyan el potencial de reclasificación de pacientes con CTC (tanto Score de calcio como angioTC coronario, con más capacidad el segundo), que afectaría también a los clasificados como de riesgo bajo. Fue elocuente, en este sentido, que la exploración de algo más de un millar de individuos asintomáticos encontró que en el 20% de ellos había un grado de aterosclerosis avanzado (106-109). Todos los investigadores están de acuerdo, no obstante, en que la técnica es poco útil en pacientes ya clasificados en el estrato de alto riesgo, pues en cualquier caso, deberán ser sometidos a tratamiento intensivo.

2.4.2.1 Experiencia clínica en mujeres

La literatura es muy escasa cuando se trata de investigar los aportes de la CTC en mujeres evaluadas en relación a su riesgo según su estado menopáusico. Un estudio incluyó a mujeres de raza asiática de edad superior a 45 años en las que, con ayuda de CTC y de GIM, se pretendió clarificar si había diferencias entre hombres y mujeres, y si el patrón en

éstas estaba o no influenciado por la menopausia (110). Se detectó un incremento de episodios cardiovasculares, que pasó de 5% al 21.2% tras la menopausia, lo que puede tomarse como indicador de un efecto de la misma. Sin embargo, la ausencia de correlación de las técnicas de imagen con datos hormonales impidió clarificar esta hipótesis.

También como rasgo diferencial en las mujeres, otro estudio encontró que un número considerable de mujeres (2.447) de la población general presentaban lesiones en coronarias detectadas por CTC a pesar de que eran clasificadas como de bajo riesgo en función de las escalas predictivas tradicionales, como la de Framingham (111). Por tanto, y de acuerdo a este estudio comparativo, parece que la CTC puede ser particularmente útil en las mujeres, pues éstas suelen ser infradiagnosticadas cuando se utilizan escalas basadas en factores de riesgo.

También de particular interés, otro estudio que ha seguido a 35.388 individuos durante una media de casi 6 años, ha encontrado una mejora considerable en la predicción de mortalidad por cualquier causa en mujeres menores de 60 años gracias a la reclasificación inducida por la CTC frente a la establecida por factores de riesgo tradicionales(112).

Existen otros estudios en los que se valora la correlación entre los hallazgos en CTC y la medición del GIM de las carótidas (96). En este se concluye que la CTC es más útil para la previsión de la EC, mientras que el GIM mediante ecografía es mejor para la valoración del riesgo de ictus. No obstante, se trata de un estudio que no valora a las mujeres de forma específica, ni se centra en el periodo inmediatamente posterior a la menopausia, pues abarca un rango de edad de 45-84 años.

Por tanto, estamos ante una opción diagnóstica con alto potencial, y que parece encontrar un perfil particularmente mejorado cuando se trata de población femenina. No hay, a la luz de lo revisado, datos en la literatura que, en mujeres con post-menopausia relativamente reciente, investiguen el patrón de factores de riesgo, incluyendo los hormonales, junto con los cambios en la pared vascular de carótidas y coronarias. El potencial de la CTC, por otro lado, parece de particular interés en mujeres postmenopáusicas más jóvenes. Esto es importante, pues los primeros años tras la menopausia reflejan la ventana en la que se inician y desarrollan los procesos de aterogénesis en la pared vascular.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS:

3.1.1 Objetivo principal

De acuerdo con el título de la tesis, es doble. Por un lado, describir el comportamiento de dos biomarcadores de imagen de aterosclerosis, el GIM en carótida y la CTC, en mujeres en un intervalo etario en el que el desarrollo de aterosclerosis subclínica comienza a ser prevalente, y por otro lado, investigar si el comportamiento de ambos biomarcadores está influenciado por la impregnación estrogénica. Esta última variable se evaluó de dos formas, con los niveles circulantes de estradiol (E2) y con el patrón de polimorfismos relacionados con la acción estrogénica.

3.1.2 Otros objetivos

3.1.2.1 Investigar si hay o no paralelismo en los cambios descritos en dos territorios vasculares diferentes, carótida y coronaria.

3.1.2.2 Investigar si los cambios en cada uno de los territorios se relacionan con un abanico de factores de riesgo clínicos relacionados con riesgo cardiovascular, tales como la edad, años desde la menopausia, índice de masa corporal, perímetro de cintura, tensión arterial, y la escala de riesgo RUTH.

3.1.2.3 Investigar si los cambios en cada uno de los territorios se relacionan con parámetros analíticos tradicionales relacionados con riesgo cardiovascular, tales como lípidos, insulina, índice HOMA, vitamina D, PCR ultrasensible.

3.1.2.4 Investigar si los cambios en cada uno de los territorios se relacionan con parámetros analíticos recientemente relacionados con riesgo cardiovascular, tales como DKK1.

3.1.2.5 Investigar si los cambios en cada uno de los territorios se relacionan con otros parámetros analíticos, tales como hormonas tiroideas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Comité de ética

Este proyecto fue sometido al Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario de Valencia, que lo aprobó en el curso de las actuaciones previas a la remisión del proyecto a la convocatoria competitiva de la Fundación ERESA.

4.1.2 Participantes

Se trata de un estudio clínico transversal, sin intervención por tanto, en el que se incluyó a una población de mujeres postmenopáusicas asintomáticas desde el punto de vista cardiovascular, que, en su mayoría, habían superado los primeros años post-menopausia. Dada la prevalencia creciente de factores de riesgo de ECV con la edad, entre ellas había un grupo considerable con presencia de uno o más factores de riesgo que, cuando se consideró apropiado, fueron integrados en una escala de puntuación ya usada en el estudio *Raloxifene Use for the Heart* (RUTH) (113).

Las participantes procedían de la consulta de salud de la mujer del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Todas ellas eran de raza caucásica y habitantes de medio urbano, con un nivel socioeconómico medio o medio-bajo. El diagnóstico del estado postmenopáusico se confirmó por la conjunción necesaria de factores clínicos, edad superior a 40 años y al menos un año de amenorrea, y analíticos, hormona folículo estimulante (FSH) superior a 40 mUI/ml y E2 en rango postmenopáusico. De acuerdo a lo

aprobado por el Comité de Ensayos e Investigación Clínica, este estudio cumplió con los requerimientos de la Declaración de Helsinki, a todas las participantes se les explicó el motivo del estudio, y todas dieron su consentimiento firmado al mismo.

Tras la historia clínica y anamnesis sobre hábitos de vida, incluyendo la presencia de factores de riesgo cardiovascular, ejercicio y consumo de alcohol o tabaco, o consumo de fármacos, se les realizó una exploración clínica básica, general y ginecológica. Para la primera, se midió talla, peso, perímetro de cintura y presión arterial, y para la segunda, se inspeccionó genitales externos, mucosa vaginal y cérvix, se realizó una toma de citología si es que procedía, y se realizó una ecografía endovaginal.

Talla y peso se obtuvieron con una báscula clínica, que apreciaba hasta 0,5 cm para la talla y 0,1 kg para el peso. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) como el cociente entre el peso (kg) y la talla (m) al cuadrado. Para la medida del perímetro de la cintura se utilizó como punto de referencia la distancia intermedia entre la costilla inferior y el borde superior de la cresta ilíaca con el uso de una cinta métrica convencional.

En la misma visita se les solicitó valoración de parámetros analíticos, incluyendo la concentración sérica de glucosa e insulina, patrón lipídico, creatinina, transaminasas, calcio total, fósforo, fosfatasa alcalina total, un marcador inespecífico de inflamación (proteína C reactiva –PCR-ultrasensible), 25.hidroxi-vitamina D, y hormonas. Las hormonas evaluadas correspondían al perfil reproductor, E2 y FSH, y tiroideo, hormona tiroestimulante (TSH) y tiroxina (T4) libre.

En la misma toma se separó la fracción celular sanguínea a fin de obtener material para el posterior genotipado.

Una vez recogidos estos datos analíticos, se procedió al cálculo del riesgo de ECV a través del índice RUTH (114), donde se valora diversas variables relacionadas con riesgo cardiovascular, tales como los antecedentes personales de ECV, presencia o no de diabetes, hipertensión arterial (HTA), IMC, niveles de LDL, HDL y triglicéridos, o si la paciente es fumadora o no.

La población estudiada se considera que será representativa debido a que existen datos en la literatura de que en el caso que nos atañe, los resultados no se ven alterados entre las distintas razas, pues presentan resultados muy similares en todas ellas (53, 78-80).

4.2 Métodos.

4.2.1 Medición en suero de hormonas y de bioquímica básica

Las condiciones de la toma de muestra de sangre siguieron requisitos estandarizados. En primer lugar, las pacientes debían estar en ayunas desde la noche anterior, tomando la muestra en un rango horario específico comprendido entre las 8 y las 10 de la mañana. A partir de la muestra, se procedió a la extracción de suero para realizar el estudio hormonal y bioquímico. También se obtuvo plasma para efectuar el estudio de la fracción celular y la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN).

La medida de glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, fosfatasa alcalina, aspartato transaminasa, glutámico-piruvico transaminasa, glutamil-transpeptidasa, deshidrogenasa láctica y perfil lipídico completo se realizó utilizando métodos enzimáticos con un autoanalizador (AU-5000 Olympus, Mishima, Japón). Las concentraciones de FSH (mIU/ml) fueron medidas mediante un inmunoensayo específico comercial basado en el principio de la quimioluminiscencia (BioMérieux Inc., Hazelwood, MO). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron inferiores a 10.0%. El E2 sérico (pg/ml) se midió mediante fluoroinmunoensayo (Delfia, Perkin/Elmer, Turku, Finlandia). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron inferiores a 5.8% y 6.1%, respectivamente.

La determinación cuantitativa de la vitamina D (25OHD) se llevó a cabo mediante el test Elecsys Vitamin D Total Assay (Roche Diagnostics Ltd, CH). Se trata de un ensayo de competición basado en la electro-quimioluminiscencia que permite la determinación de la 25 hidroxivitamina

D total circulante. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores a 6,5% y 11,5% respectivamente.

Las determinaciones de insulina sérica se realizaron mediante el kit C-Peptide ELISA (IBL International GMBH, Hamburg, Germany). Consiste en un kit que mide el péptido C en suero. El péptido C es una molécula que presenta cantidades equimolares con la insulina pues es el encargado de la conexión de las cadenas A y B de la molécula de insulina. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores a 6,7% y 10% respectivamente.

La cuantificación de T₄ se llevó a cabo mediante el Ensayo Inmunoenzimático por Quimioluminiscencia para la medición cuantitativa de Tiroxina en el suero Humano (Grupo MexLab, México). Éste es un inmunoensayo que detecta anticuerpos anti-T4 tras una reacción con peroxidasa de rábano (el marcador). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores a 5,8% y 9,7% respectivamente.

La determinación sérica de TSH se realizó mediante el Ensayo Inmunoenzimático por Quimioluminiscencia para la medición cuantitativa de la Hormona Estimulante de la Tiroides en suero (Grupo MexLab, México). Es un inmunoensayo similar al anterior en el que también se utiliza la peroxidasa de rábano como marcador para la cuantificación de los anticuerpos monoclonales. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores a 6,6% y 7,4% respectivamente.

Para la valoración de la testosterona se utilizó el kit ELISA Free Testosterone (IBL International GMBH, Hamburg, Germany), cuyos coeficientes de

variación intra e interensayo fueron inferiores a 8,9% y 14,6% respectivamente.

La medición de PCR ultrasensible se llevó a cabo mediante un laser de nefelometría, que obtiene una sensibilidad inferior a 0.04 mg/L. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron menores de 3,5% y 5,1% respectivamente.

Los niveles de osteoprotegerina (OPG) fueron medidos mediante un kit ELISA (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria), cuyos coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron inferiores al 7.0% y 8,9% respectivamente.

Los niveles de Dickkopf Homolog-1 (DKK-1; ng/ml) se midieron mediante un kit ELISA (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK). El coeficiente de variación intra-ensayo fue inferior al 8.0%. Para reducir la variación analítica, todas las muestras se midieron en el mismo ensayo.

4.3 Grosor Íntima-Media carotídeo

Este procedimiento consistió en la medición del diámetro de la íntima-media carotídea para determinar engrosamientos de la misma y así se valoró si existía un aumento del riesgo vascular, tanto cerebral como coronario. También se registró la presencia o no de placa ateromatosa en el territorio carotídeo estudiado.

4.3.1.1 Región anatómica

La región anatómica seleccionada fue el espacio cervical lateral, donde se encuentran las arterias carótidas. El origen de la arteria carótida común es diferente dependiendo del lado en estudio. En la arteria carótida común derecha, el origen está en el tronco braquicefálico derecho, que también da nacimiento a la arteria subclavia derecha. La arteria carótida común izquierda, sin embargo, nace directamente del arco aórtico en el interior del tórax. Su trayecto es en sentido craneal, en paralelo a la yugular interna y al X par craneal. Ya a nivel de la cuarta vértebra cervical (aproximadamente, pues se dan muchas variaciones anatómicas) se bifurca para dar la arteria carótida interna y la externa (figura 6).

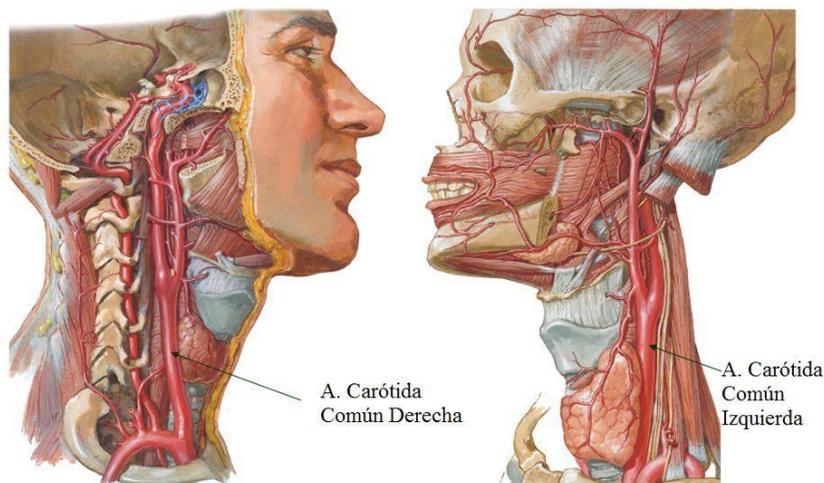


Figura 6. Región anatómica estudiada donde se objetivan ambas arterias carótidas comunes

La arteria carótida interna es la que se encarga de la irrigación cerebral, para lo que se sirve de las arterias cerebrales anteriores y medias principalmente, aunque hay otras ramas de menor entidad.

La arteria carótida externa irriga el área del cuello, la cara y el cráneo: Presenta como ramas terminales las arterias temporal superficial y la maxilar.

4.3.2 Características del ecógrafo

El ecógrafo utilizado fue un Philips HD-11 XE (ver figura 7). Consiste en un sistema que presenta un procesador de 3GHz, con 1 GB de memoria RAM DDR 400. Asocia un monitor de 50MHz con una resolución mínima de 800 puntos por línea horizontal.



Figura 7. Ecógrafo Philips HD-11 XE.

La sonda utilizada es lineal con una frecuencia modulable de entre 3 y 12 MHz, modelo L12-5 (ver figura 8).



Figura 8. Sonda lineal L12-5 de alta frecuencia de 12 MHz

4.3.3 Técnica

Se utilizó una sonda ecográfica lineal (características descritas en el apartado anterior), pues presenta un campo de visión ancho y una mayor resolución que sus homólogas convexas. Dado que en el cuello no se requiere explorar territorios de gran profundidad, las sondas lineales de alta frecuencia son herramientas particularmente apropiadas para el estudio de las arterias carótidas.

Se realizó el estudio del GIM en carótida común y bulbo de forma bilateral, y se valoró la presencia o no de placa calcificada. El estudio de la carótida común (tanto unilateral como bilateralmente) es la variable utilizada en la mayoría de los estudios recientes (53-55), aunque se ha evidenciado que en otros también se incluye el estudio específico del bulbo (55) y la presencia o no de placa calcificada (53).

La sonda se posicionó sobre la región anatómica de interés, se realizó un estudio sistematizado del mismo, tanto en planos longitudinales como en axiales, valorando la presencia o no de placa ateromatosa, y se registró el resultado. Se consideró como positiva la presencia de placa en los casos en los que se objetivaba un grosor mayor de 0,15 cm.

Para el estudio del GIM de las carótidas, se tomó 1 cm del segmento a 1 cm del bulbo carotídeo para el estudio como se recomienda en las guías más actualizadas (53-55, 115). Se evitó aquellas zonas en las que existía una placa calcificada ateromatosa. La cuantificación del GIM se realizó mediante un software (QLAB, Philips) que identifica automáticamente el trazado entre la íntima y la adventicia media a lo largo del segmento de 1 cm (figura 9), donde el sistema ofrecía los valores correspondientes. Este procedimiento

se realizó hasta en 3 ocasiones para cada carótida común y se obtuvo la media de las mismas.

Para el estudio del GIM de los bulbos carotídeos, se procedió mediante la misma sistemática anteriormente descrita, evitando también la presencia de placas ateromatosas calcificadas. En este caso, no se procedió al estudio de un segmento de 1 cm, puesto que el bulbo era de menor longitud.

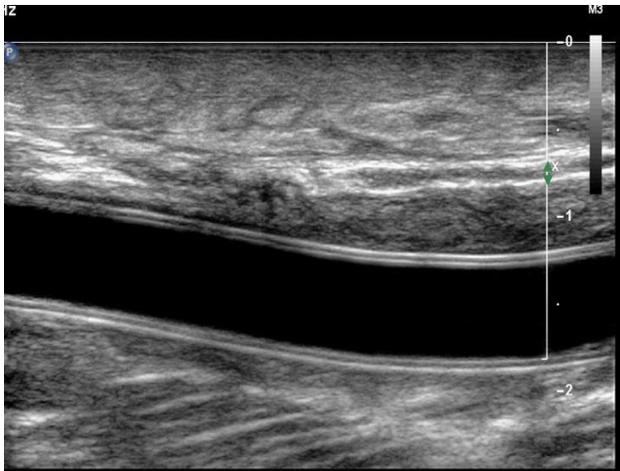


Figura 9. Región estudiada de la arteria carótida común.

4.4 Cardiotomografía computerizada

Con este procedimiento se obtienen dos tipos de información. En primer lugar se determina la cantidad total de calcio en las arterias coronarias (*score* de calcio coronario), que sirve como estimación del grado de aterosclerosis de las mismas. En segundo lugar, con la administración de medio de contraste (angioCT de coronarias) se pueden identificar y cuantificar las estenosis coronarias, tanto las calcificadas como las que no lo están.

4.4.1 Región anatómica

La exploración se adquirió en el territorio anatómico que se extiende desde el ápex cardíaco hasta el tercio proximal de la aorta. De esta forma se consiguió incluir a la totalidad de las arterias coronarias, que tienen su origen en la aorta (figura 10). Las arterias coronarias surgen de los senos de Valsalva, derecho [arteria coronaria derecha (ACD)] e izquierdo [arteria coronaria izquierda (ACI)].

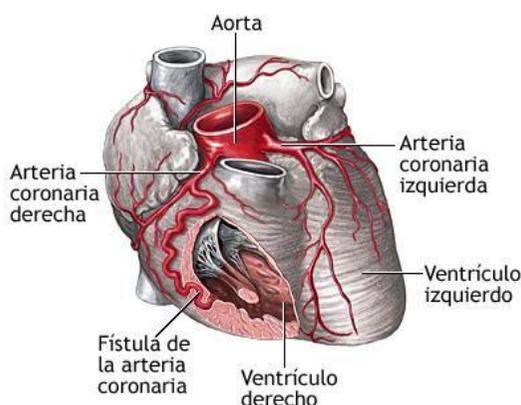


Figura 10. Anatomía de las arterias coronarias.

Tras su salida, la ACD discurre por el surco atrioventricular derecho, dando ramas para la correcta vascularización de la zona. En el caso de que exista una dominancia derecha (60-80% de la población (116)), la arteria descendente posterior se origina de la arteria coronaria derecha. Posteriormente la arteria se divide originando la arteria descendente posterior, que discurre por el surco interventricular posterior dando ramas perforantes y ramas terminales que alcanzan el tercio inferior del septo interventricular anterior, y la arteria posterolateral derecha que discurre hacia el surco auriculoventricular izquierdo.

La ACI se bifurca pronto en dos ramas, la arteria coronaria circunfleja y la arteria coronaria descendente anterior (figura 10). En aproximadamente un 33% de la población se objetiva una trifurcación, donde existe una rama intermedia que recibe el nombre de rama marginal obtusa o ramo intermedio (figura 10). En el caso de que la dominancia sea izquierda, la arteria coronaria descendente posterior se originaría a partir de la arteria coronaria circunfleja (aproximadamente 20% de los casos (116)). El recorrido de la arteria descendente anterior transcurre por el surco interventricular anterior dando ramas septales perforantes y ramas diagonales, irrigando el área anterior, medial y lateral del ventrículo izquierdo.

4.4.2 Características técnicas de la cardiografía computerizada

Se utilizó un equipo de General Electric modelo Light Speed con tecnología de 64 cortes (figura 11), siguiendo el protocolo que se describe a continuación.



Figura 11. TC General Electric LightSpeed 64X.

4.4.3 Sistemática de la exploración

4.4.3.1 Electrocardiograma (ECG) y colocación de electrodos

Se utilizó un ECG para la sincronización del estudio con el latido cardíaco y así obtener la mayor calidad en la imagen diagnóstica. En el caso de que la frecuencia cardíaca se encontrara por encima de 65 latidos por minuto (lpm) se administraba un fármaco betabloqueante (si no existía contraindicación). Para que la recepción del ECG fuese lo más precisa posible, los electrodos se dispusieron como muestra la Figura 12 que incluye distintas ubicaciones posibles en función de cada paciente.

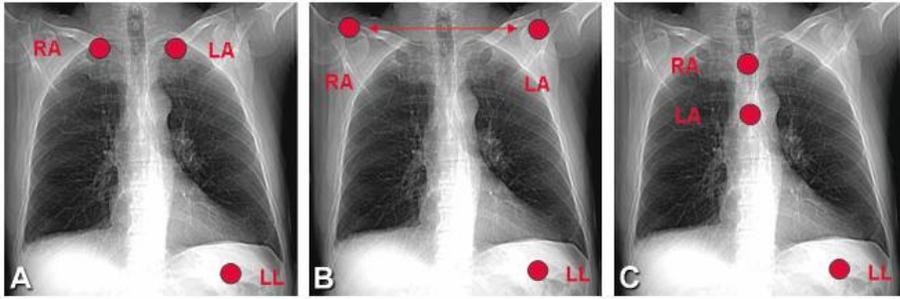


Figura 12. Alternativas para la colocación de los electrodos (116)

4.4.3.2 Parámetros de adquisición

A continuación (en la tabla 3) se exponen los parámetros de adquisición del Score de calcio y del angioTC coronario.

Parámetro de escaneado	Valor Score de calcio	Valor (angioTC coronario)
Tipo de Escaneado	Helical cardíaco	
Tiempo Rotación	0,35 s	
Cobertura	Corazón completo	
Grosor de Corte	2,5 mm	0,625 mm
Intervalo	20 mm	0,625 mm
Scan Field of View	Cardíaco grande	
Display Field of View	25 cm (en el caso del estudio coronario se modificará si necesario)	
mA	430	100-400 (dependerá del peso)
kVp	120	
Pitch	No tiene	Se ajusta automáticamente
Post-procesado	Score de Calcio	Estándar
Dosis Radiación (mGy/cm)	1150-1750	

Tabla 3. Parámetros de adquisición y medio de contraste

4.4.3.3 Reconstrucción de la imagen y posterior lectura

Una vez completado el escaneado del corazón, se realizó la reconstrucción de las adquisiciones para realizar el diagnóstico.

En el caso del angioTC coronario, se dividió el ciclo cardíaco en porcentajes que avanzan de 10% en 10% desde el 0% hasta el 90%. Tras ello, se seleccionaron las mejores fases para el estudio coronario, que

habitualmente fueron la del 70-80% (diástole prácticamente finalizada) para la arteria descendente anterior y la del 40-60% (final de sístole e inicio de diástole) para la arteria coronaria derecha, siendo variable para la arteria circunfleja. El motivo de seleccionar estos intervalos tan concretos del ciclo cardíaco es la necesidad de analizar aquella fase en la cual una determinada arteria carece de movimiento, evitando así los artefactos por éste.

A continuación se procedió al estudio y cuantificación de las estenosis existentes en los distintos vasos. Para ello se realizó en primer lugar una reconstrucción tridimensional de los vasos así como reconstrucciones multiplanares, en éstos se detectaron las estenosis y a continuación se procedió a su cuantificación. Se trató de un proceso automatizado con supervisión humana, para asegurar el correcto marcaje de los vasos y la correcta toma de referencias, tanto de la zona estenótica como de la sana para su comparación. Así, el sistema obtuvo, mediante el estudio comparativo entre el área marcada como lesión y la zona de referencia, el porcentaje de estenosis del vaso estudiado.

Así mismo, de forma automática al realizar el escaneado, se realizó una cuantificación automática del calcio en las arterias coronarias obviando el medio de contraste y ofreció unos valores totales de calcio (puntuación de calcio - *Calcium Score*) mediante una cuantificación numérica que estratifica los niveles de riesgo. Los niveles de riesgo se calculan según el valor numérico como se describe en la tabla 4.

Resultado del score de calcio coronario	Nivel de riesgo
0	Sin Riesgo
<100	Bajo
100-400	Moderado
401-1000	Alto
>1000	Muy Alto

Tabla 4. Estratificación del riesgo de evento cardíaco según el resultado del score de calcio coronario

4.5 Genotipado

Los ensayos de genotipado (ejemplo en figura 13) se llevaron a efecto en las instalaciones del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico de Valencia (INCLIVA), por personal especializado. Para el análisis de los polimorfismos de nucleótido simple (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) se utilizó sondas TaqMan de *Applied Biosystem* mediante PCR cuantitativa en tiempo real, y el software termociclador para la discriminación alélica.

Se analizaron 4 SNPs del gen ER α , dos de ellos localizados en el intron 1 (C>T, rs2234693; y A>G, rs9340799), otro en el intron 4 (A>T, rs28385619), y un cuarto SNP localizado en el exón 8, dentro de la región 3' no traducida (T>C, rs3798577). Para el gen ER β se estudiaron dos SNPs localizados en el intron 2 (C>T, rs1256030) y en el intron 8 (G>A, rs4986938). Con respecto al gen de la aromatasa se analizaron 3 SNPs localizados en el intron 1 (C>G, rs1062033), en el exón 3 (A>G, rs700518) y en la región 3' no traducida (rs700518).

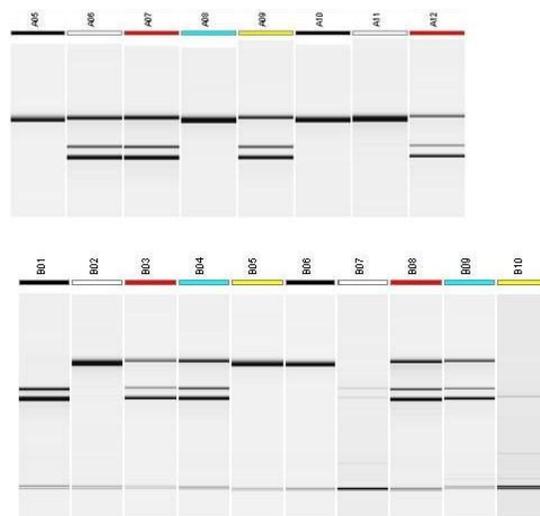


Figura 13. Ejemplo de genotipado

4.5.1 Obtención de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de células nucleadas aisladas de sangre periférica (ver apartado anterior) mediante un kit de extracción de ADN genómico (RealPure Extracción ADN genómico, REAL, Durviz, Valencia, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este método consiste en una lisis celular mediante un detergente aniónico seguido por un paso de precipitación salina de las proteínas. El ADN se obtiene del sobrenadante tras la eliminación de las proteínas mediante precipitación con isopropanol. Tras un par de lavados con etanol al 70%, el ADN se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8) y se congeló a -80°C hasta su uso.

4.6 Análisis estadístico de los resultados

En el análisis de los datos, se aplicó un Modelo Lineal General (MLG) de análisis de la variancia multivariante (MANOVA). Este procedimiento proporciona un análisis de regresión y un análisis de variancia para múltiples variables cuantitativas dependientes (en nuestro caso, las 4 variables resultantes de medir el grosor de las paredes de las arterias y senos carotídeos internos izquierdos y derechos) por una o más covariables cuantitativas [en nuestro caso, los niveles basales plasmáticos de vitamina D, proteína C reactiva de alta sensibilidad, E2, triglicéridos, insulina, glucosa, FSH, colesterol, HDL, LDL, DKK-1, OPG, T4 y TSH; perímetros de la cintura y cadera; presión arterial; valor de la valoración del modelo homeostático de la función de las células β (HOMA- β); edad de las mujeres en el momento de la analítica; y número de años post-menopausia] o factores categóricos (en nuestro caso, la variable dicotómica que registra la presencia o ausencia de placas de ateroma en las arterias y senos carotídeos) independientes (variables predictoras).

Para aplicar el modelo MLG Multivariante, se asumieron dos supuestos: 1) los datos de las variables dependientes eran una muestra de vectores aleatoria perteneciente a una distribución normal multivariante; y 2) la matriz de varianzas-covarianzas era igual en todos los grupos. Además, debido a que no hay razones para aplicar un modelo MLG multivariante si las variables dependientes no están correlacionadas, se practicó la prueba de esfericidad de Bartlett, la cual permite contrastar la hipótesis nula de que la matriz de varianzas-covarianzas residual es proporcional a una matriz identidad, es decir, la hipótesis de que las variables dependientes no están correlacionadas y son independientes entre ellas.

Se realizó el test de una-muestra de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si las variables seguían una distribución normal. Cuando las variables no presentaban esta distribución, se aplicó la transformación logarítmica o raíz cuadrada para inducir la normalidad.

Para determinar si existían efectos significativos de las covariables y del factor categórico sobre las 4 variables dependientes simultáneamente, se utilizó el estadístico Wilks' lambda. El procedimiento MLG MANOVA aplicado proporcionó la estima de los parámetros, así como los análisis de la varianza univariantes (ANOVAs) para cada una de las 4 variables dependientes por separado. Esto permitió que, cuando el análisis multivariante evidenciaba un efecto significativo sobre las 4 variables dependientes simultáneamente, se pudiese concretar, discernir y localizar sobre cuál(es) de las 4 variables dependientes las covariables y/o el factor categórico ejercieron un efecto significativo. En estos ANOVAs, se aplicó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, la cual contrasta la hipótesis nula de que la varianza de cada una de las variables dependientes es la misma en los 2 niveles del factor categórico. En las comparaciones entre grupos, se adoptó el nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Todo el análisis estadístico se realizó con el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (*IBM SPSS Statistics, versión 22; © Copyright IBM Corporation 1994-2013*).

A no ser que se especifique lo contrario, los valores de las medias de las 4 variables dependientes especificados en el texto y tablas son medias marginales estimadas. Estas medias están corregidas por los efectos de las covariables introducidas en el modelo. Los errores se expresan como errores estándares de las medias o desviación estándar, según sea apropiado.

5. RESULTADOS

5.1 Descripción de la muestra

Este apartado incluye, como primer paso, los rasgos clínicos de la población investigada, seguido de los parámetros analíticos y de los resultados de las pruebas de imagen.

La media y la mediana de edad de las participantes fue de 63 años con rango de 42 a 82 años y, como se observa en la figura 14, la mayoría se acumulaba entre 56 y 70 años. Se daba un total de 92 pacientes.

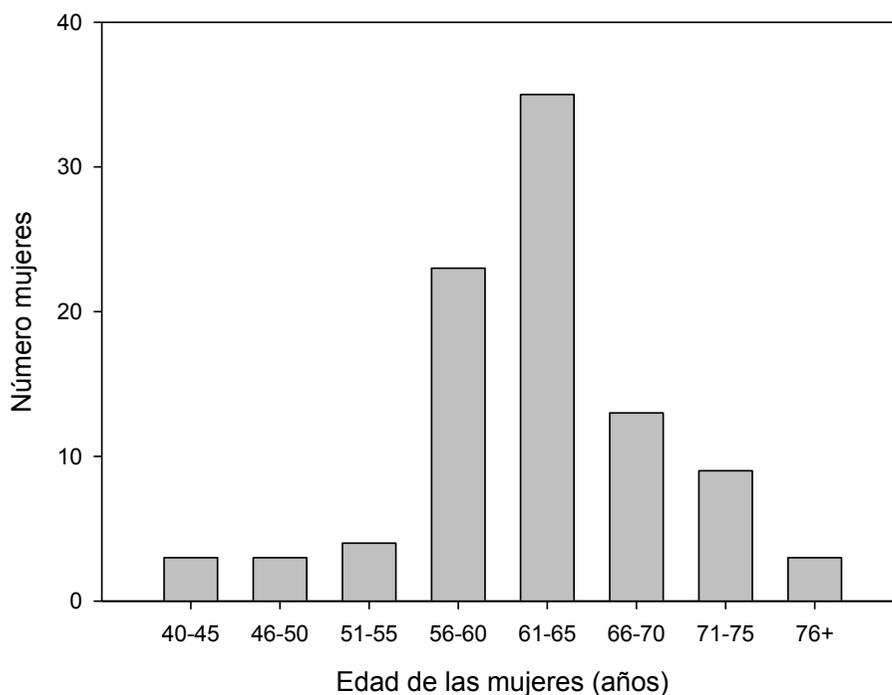


Figura 14. Distribución en grupos de edad de las pacientes a estudio

La edad media de la menopausia fue de 47 años, siendo menopausia artificial en 21 casos. El tiempo medio transcurrido desde el inicio de la

menopausia fue de 10,8 años. Otros rasgos clínicos de la población se encuentran en las tablas y figuras que siguen.

Nº gestaciones	Nº mujeres
0	8
1	9
2	34
3	29
4+	12

Tabla 5. Número de gestaciones de las mujeres incluidas

El IMC está representado en una tabla a continuación, donde se objetiva el número de casos que presentan un índice dentro de la normalidad (<24,5), sobrepeso (<30) y obesidad (>30).

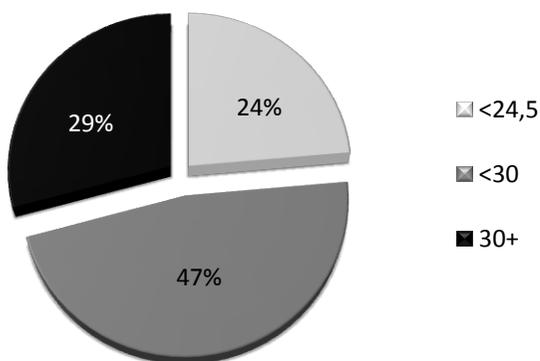


Figura 15. Proporción de la muestra en relación al IMC

El perímetro de la cintura de las pacientes presentaba un valor medio de 90,1 cm con una mediana de 88,5 cm. La distribución de las pacientes se describe de forma más visual en la gráfica siguiente (figura 16).

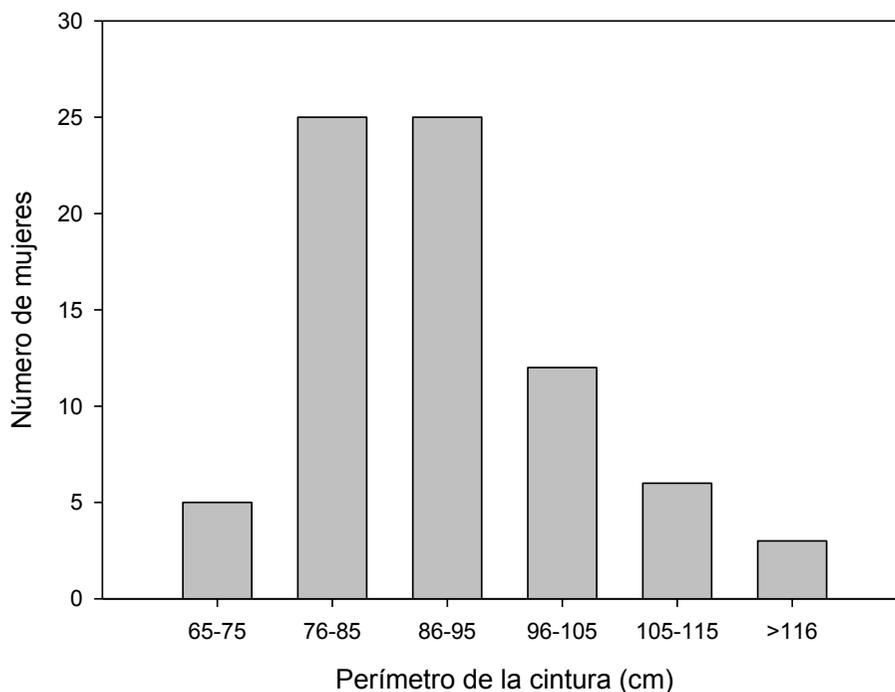


Figura 16. Distribución del perímetro de cintura de las mujeres estudiadas

Respecto a los factores de riesgo cardiovascular clásicos, hubo 42 casos de HTA, utilizando como criterio la presión arterial sistólica mayor de 140 mmHg y/o la diastólica superior a 90mmHg. Un 11% de las participantes fumaba, lo que es inferior al 22.5% de fumadores en la población española según la Encuesta Nacional de Salud 2011-2012 del Instituto Nacional de Estadística.

	Nº Pacientes	% del Total
HTA	42	55
Presión arterial normal	34	45
No fumadoras	81	89
Fumadoras	10	11

Tabla 6. Proporción de pacientes con HTA y fumadoras esta tabla no está citada en el texto

En las mujeres incluidas en el estudio, se dieron unos niveles de vitamina D muy dispares, como se objetiva en la gráfica a continuación. Este dato destaca en su importancia debido al auténtico debate existente en la comunidad científica sobre el papel de la citada vitamina en la evolución del riesgo cardiovascular.

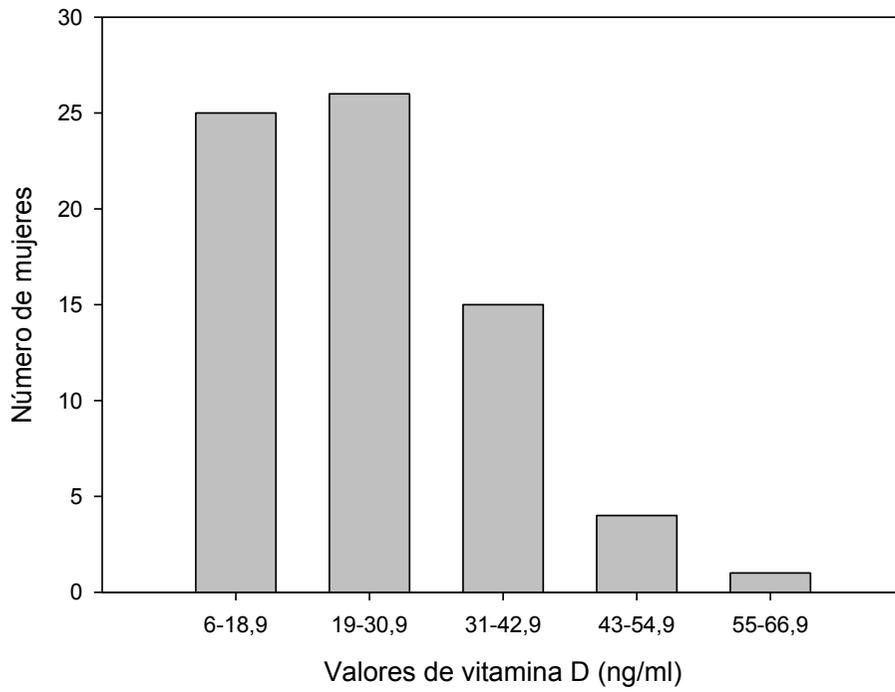


Figura 17. Distribución en de las mujeres en función de sus niveles de Vitamina D

Finalmente, se realizó una evaluación general del riesgo vascular mediante el test RUTH, donde salvo algún caso excepcional, se obtuvieron resultados de bajo riesgo en la mayoría de la población (hallazgo altamente predecible dados los inexistentes antecedentes vasculares de los sujetos incluidos en el estudio). En la gráfica siguiente se describen estos hallazgos, siendo claramente predominante el escaso riesgo de la población estudiada.

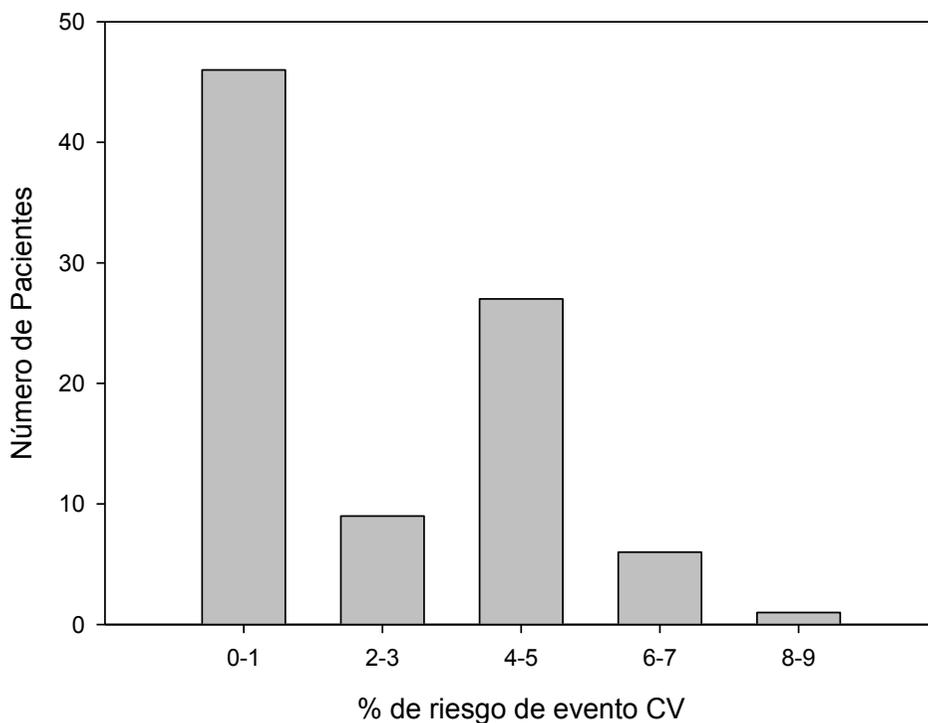


Figura 18. Distribución en de las mujeres en función del riesgo de evento cardiovascular según el test RUTH

5.2 Datos clínicos y analíticos

A continuación se representan todos los datos que han sido incluidos en el estudio. Se representan los valores medios con su desviación estándar en la tabla a continuación.

	N	Media	Desviación Estandar	Mediana	Rango Intercuartílico
Vitamina D	71	25,1	± 11,23	23,1	16,6-31,5
PCR (mg/L)	29	3,1	± 3,60	1,8	1,03-3,55
Cintura (cm)	76	90,1	± 12,30	88,5	81-96,25
Estradiol (pg/ml)	89	16,0	± 10,84	15,1	9,2-20,1
Testosterona (ng/dL)	18	0,6	± 0,68	0,4	0,25-0,64
FSH	90	77,3	± 36,72	70,4	53,73-97,78
Triglicéridos	91	105,5	± 58,66	92	69-115
Colesterol	91	207,3	± 28,51	204	194-222,5
LDL	90	122,6	± 23,90	121,5	105,25-136,75
HDL	91	63,2	± 15,86	62	52,5-71,5
T ₄	82	1,2	± 0,22	1,2	1,1-1,3
TSH	84	3,2	± 4,56	2,5	1,66-3,40
Glucosa (mg/dL)	90	114,5	± 40,00	104	94-120,5
Insulina (μUI/ml)	70	10,2	± 8,80	8,3	5,03-11,7
OPG	61	179,2	± 310,39	107,8	74-144,8
HOMA	69	81,1	± 59,22	67,8	46,28-99,85
DKK1	34	4,0	± 2,32	3,7	3,03-4,68
GIM general (mm)	353	0,69	± 0,15	0,7	0,6-0,77
GIM Carótida Derecha (mm)	88	0,7	± 0,11	0,6	0,6-0,7
GIM Carótida Izquierda (mm)	91	0,7	± 0,14	0,7	0,61-0,74
GIM Bulbo Derecho (mm)	85	0,7	± 0,14	0,7	0,59-0,79
GIM Bulbo Izquierdo (mm)	89	0,7	± 0,18	0,7	0,62-0,8

Tabla 7. Medias y sus desviaciones estándar de los datos analíticos y cuantitativos estudiados

5.3 GIM de carótida

Se describe a continuación el resultado del análisis de asociación estadística entre los parámetros ecográficos en pared vascular de carótida (GIM carotídeo y bulbar y la presencia de placa mediante ecografía) y los demás factores de riesgo incluidos en el estudio. A fin de simplificar la descripción, se muestra solamente aquellas asociaciones en las que se detectó significación estadística. El orden a seguir será el de factores de riesgo clínicos, seguidos de los parámetros analíticos. Los resultados con SNPs de genes relacionados con la acción estrogénica se describirán juntos en una sección final.

5.3.1 GIM de carótida frente a edad

La edad se mostró también como un factor asociado positivamente al GIM en ambas carótidas ($p=0,028$ en la izquierda y $0,027$ en la derecha).

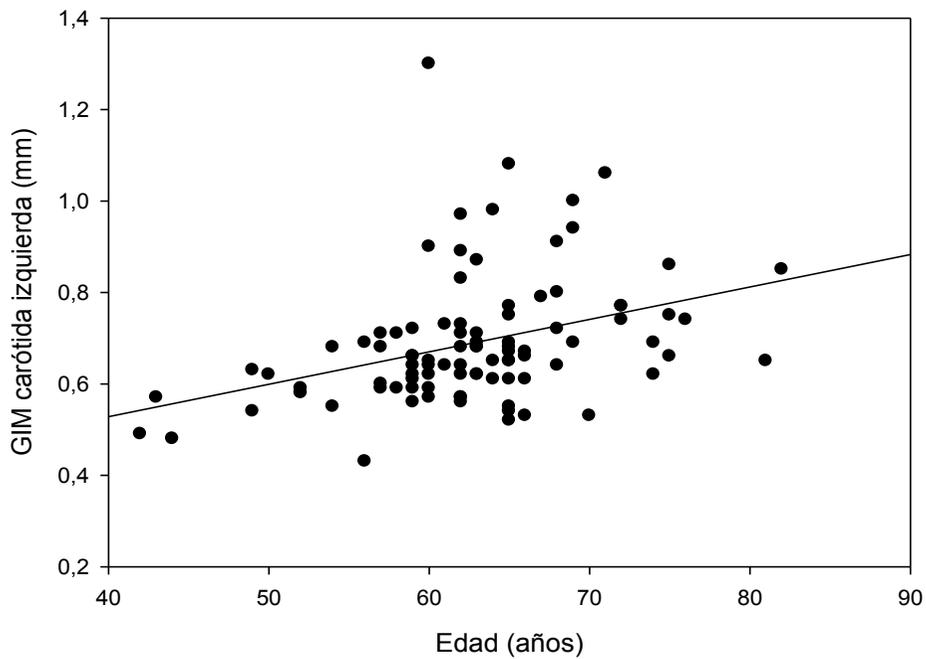
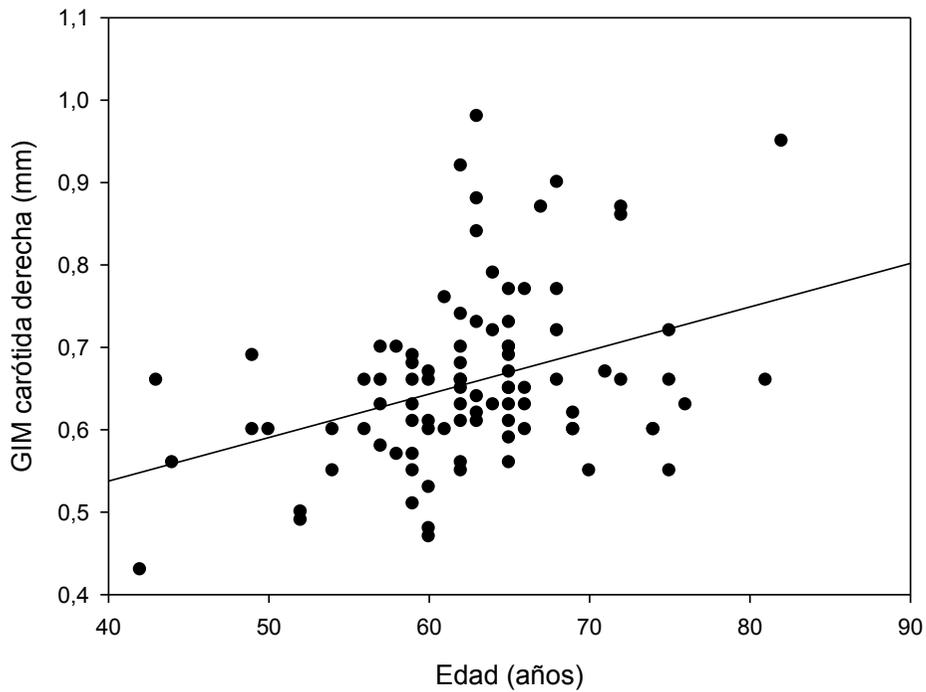


Figura 19. Estudio del GIM carotídeo bilateral frente a edad

5.3.2 GIM de carótida frente a años desde la menopausia

Se encontró un incremento del GIM izquierdo en relación con el número de años desde la menopausia, que rozó la significación estadística ($p=0,055$), y con una distribución que sugiere una clara tendencia.

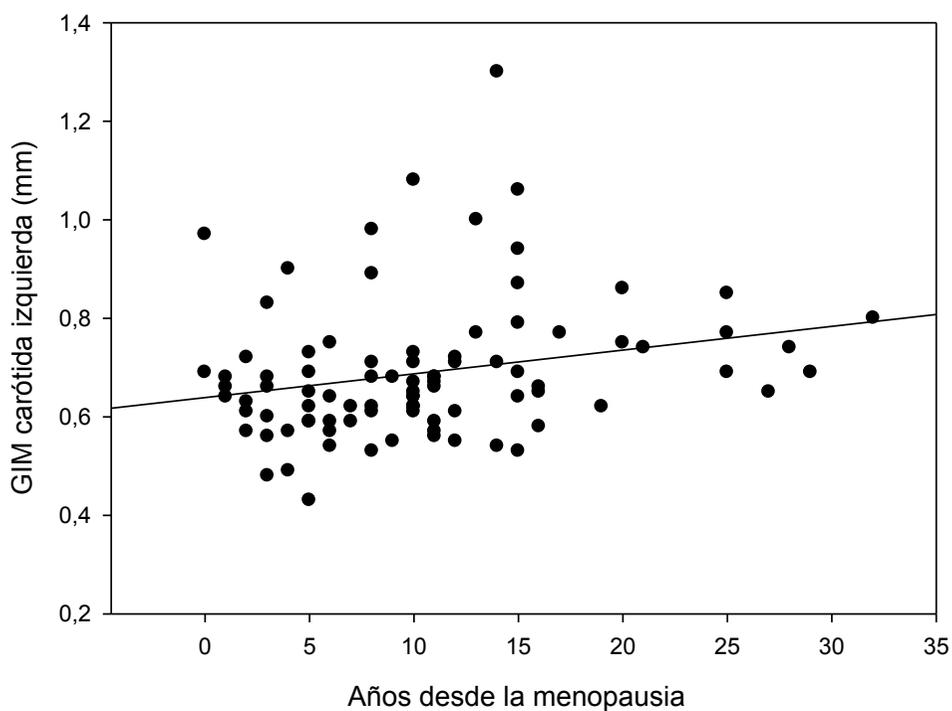


Figura 20. Estudio del GIM carotídeo izquierdo frente a años desde la menopausia

5.3.3 GIM de carótida frente a perímetro de cintura

La gráfica muestra la asociación estadística entre el GIM de la carótida izquierda y el perímetro de la cintura. Existe una tendencia al incremento del GIM en relación al aumento del perímetro de la cintura, siendo los resultados estadísticamente significativos ($p=0,035$). En el lado contralateral los resultados mostraron una $p=0,68$.

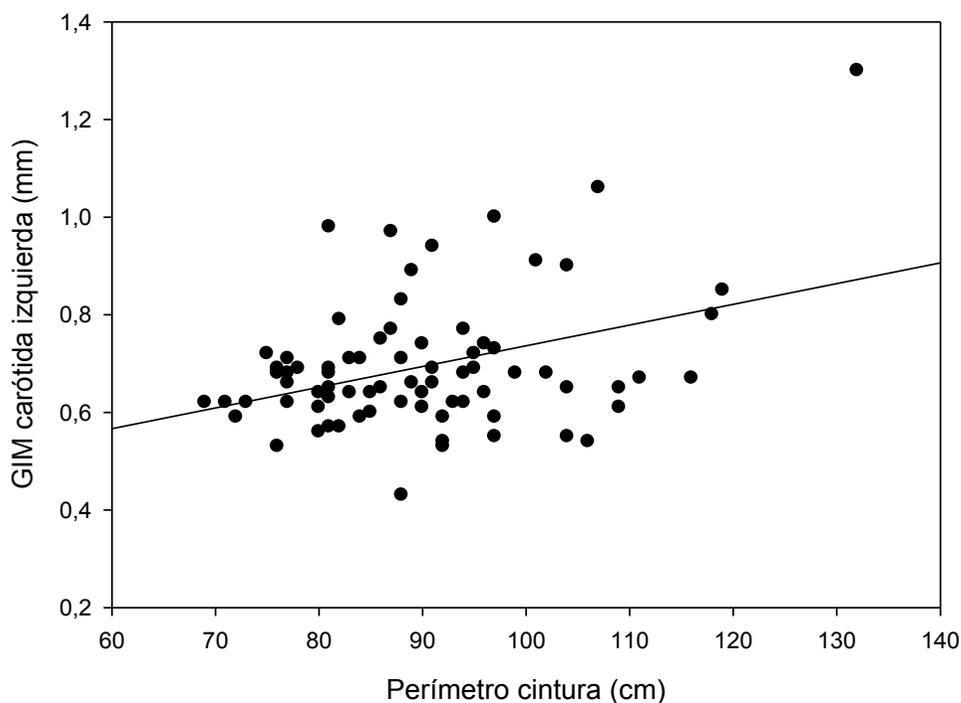


Figura 21. Asociación de GIM carotídeo izquierdo con perímetro cintura

5.3.4 GIM de carótida frente a proteína C reactiva

La gráfica muestra el estudio estadístico entre los valores de PCR y el GIM de la carótida. Como se puede observar, existe una clara tendencia al incremento del grosor carotídeo derecho en relación al aumento de los niveles de PCR sérico, siendo los resultados estadísticamente significativos ($p=0,015$).

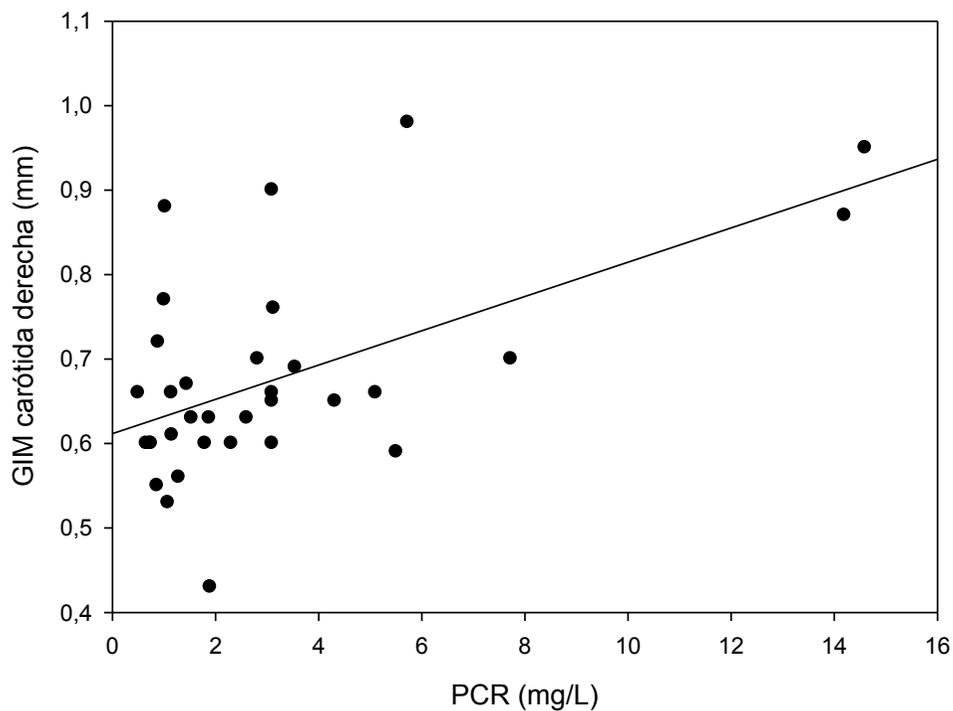


Figura 22. Estudio del GIM carotídeo derecho frente a PCR

5.3.5 GIM de carótida frente a glucosa

Los niveles de glucosa mostraron también una asociación estadística con el GIM de la carótida izquierda ($p=0,021$). Como se puede observar, existe una mínima tendencia al incremento del GIM con el aumento de los niveles de glucosa. No obstante, se puede identificar un mayor potencial discriminativo con los niveles de glucosa sérica superiores a 120 mg/dL. En el lado contralateral los resultados mostraron una $p=0,78$.

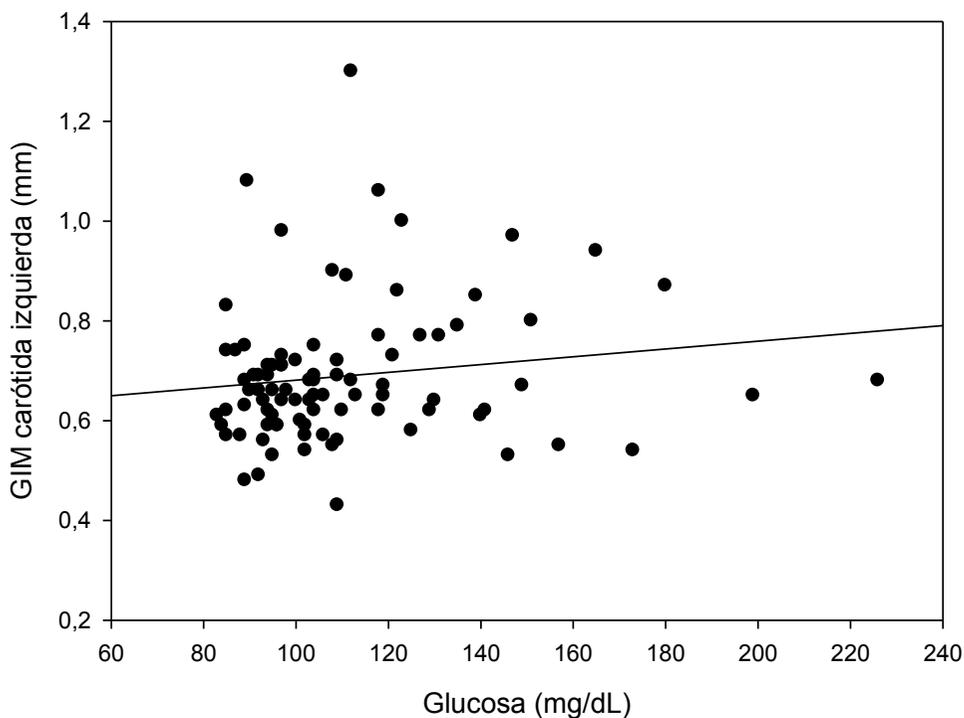


Figura 23. Estudio del GIM carotídeo izquierdo frente a glucosa sérica

5.3.6 GIM de carótida frente a insulina

Como ocurrió con la glucosa, y con un patrón no muy distinto de la misma, los niveles de insulina se asociaron también significativamente ($p=0,011$) y de forma positiva con los valores de GIM en carótida izquierda. Existe una concentración de los valores insulínicos entorno a las 10 $\mu\text{UI/ml}$, valor considerado dentro de la normalidad.

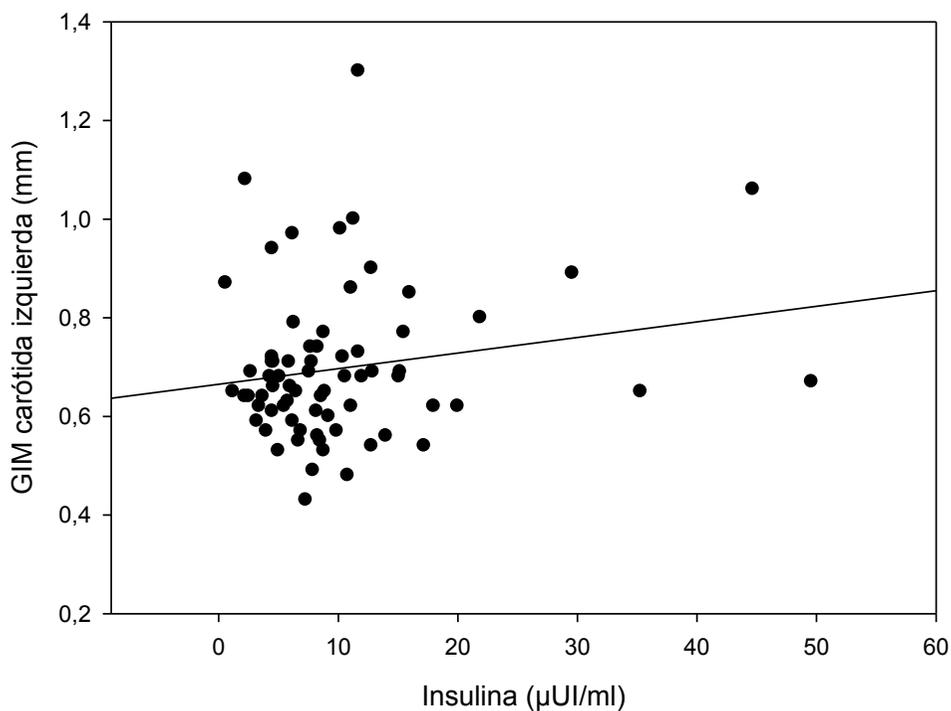


Figura 24. Estudio del GIM carotídeo izquierdo frente a insulina sérica

5.3.7 GIM de carótida frente a estradiol

Los niveles de estradiol se asocian de forma significativa ($p=0,002$ para carótida izquierda y $p=0,034$ para la derecha) con los del GIM en ambas carótidas. Como se objetiva en las figuras 25 y 26, los valores del GIM de ambos vasos presentan un descenso de su grosor a medida que los niveles de estradiol sérico se incrementan.

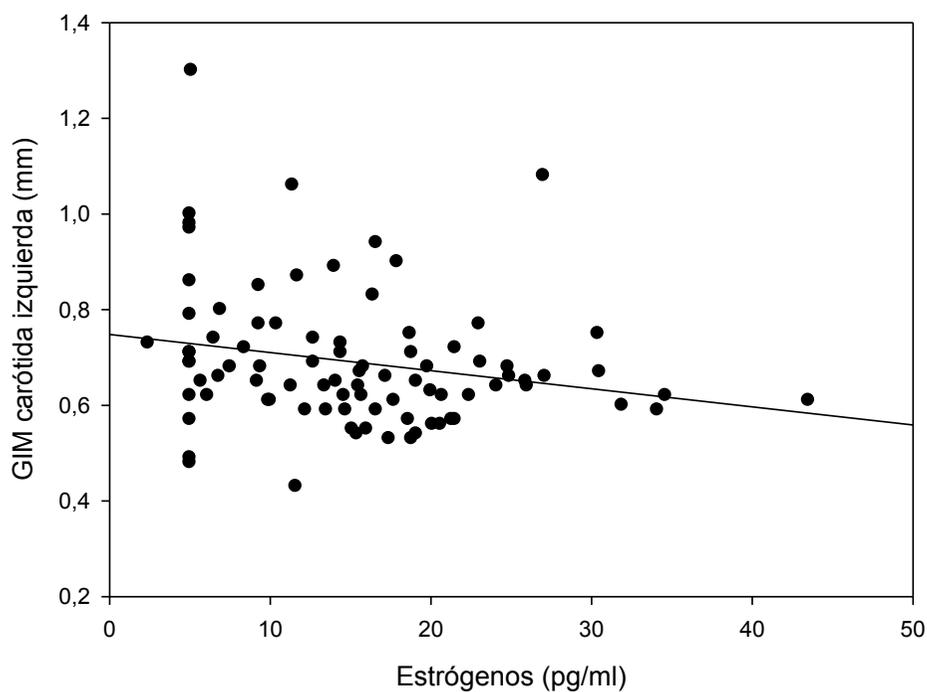


Figura 25. Estudio del GIM carotídeo izquierdo frente a estradiol

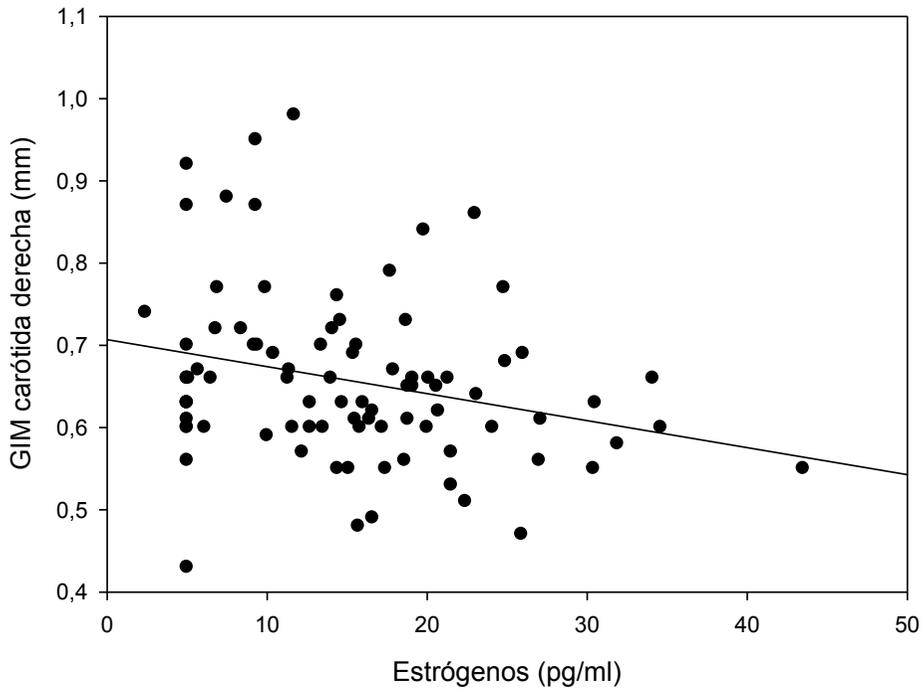


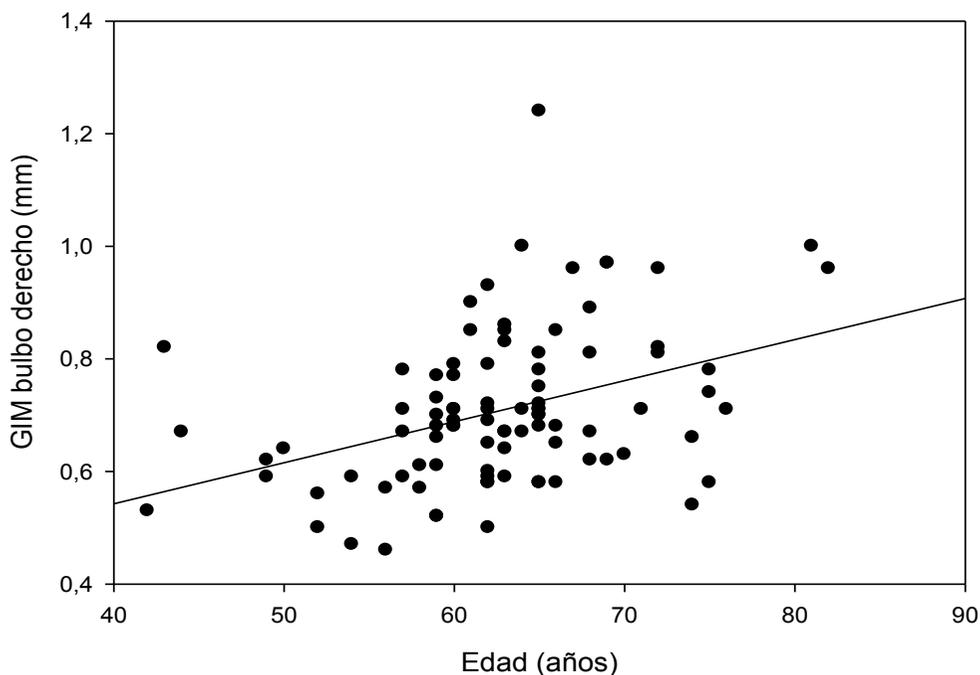
Figura 26. Estudio del GIM carotídeo derecho frente a estradiol

5.4 GIM de bulbo carotídeo

Los valores en bulbo presentaron menos poder discriminativo que los observados en carótida común, pero reprodujeron prácticamente todos los valores que en carótida aparecieron con asociación más potente.

5.4.1 GIM de bulbo carotídeo frente a edad

La gráfica muestra el estudio estadístico entre la edad y el GIM del bulbo carotídeo. Se identifica una clara tendencia del valor del GIM en la carótida derecha al incremento en edades más elevadas. En ambos casos, los resultados fueron estadísticamente significativos ($p=0,002$ en carótida común derecha y $p=0,001$ en izquierda).



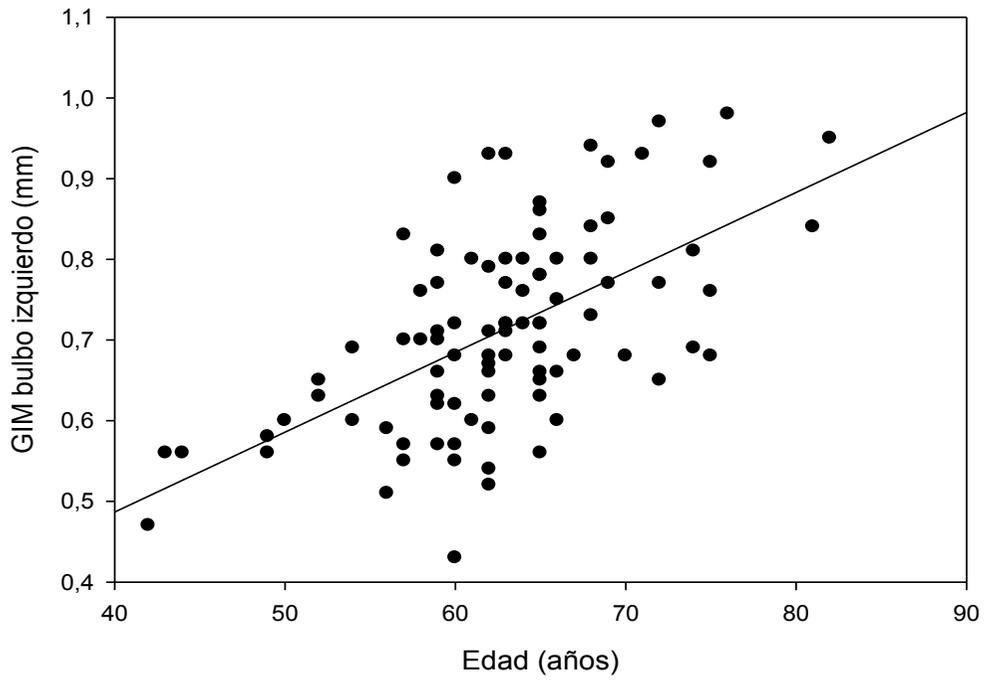


Figura 27. Estudio del GIM de bulbo bilateral frente a edad

5.4.2 GIM de bulbo frente a años desde la menopausia

Como se detectó para la carótida común, también aquí se detectó una asociación positiva entre el grosor del bulbo izquierdo y el número de años desde la menopausia ($p=0,068$).

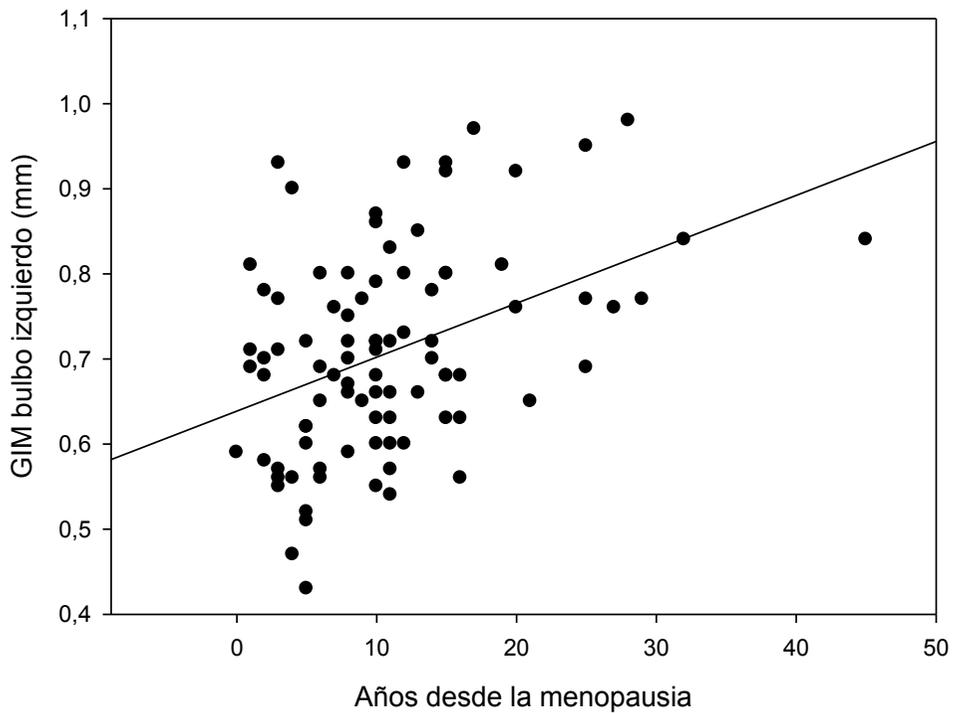


Figura 28. Estudio del GIM del bulbo izquierdo frente a años desde la menopausia

5.4.3 GIM de bulbo frente a niveles de estradiol

La gráfica muestra el estudio estadístico entre los niveles séricos de estradiol y el GIM del bulbo carotídeo. Existe una importante dispersión de los valores representados con una discreta tendencia al incremento del grosor del bulbo derecho en relación a la disminución de los niveles estrogénicos ($p=0,096$).

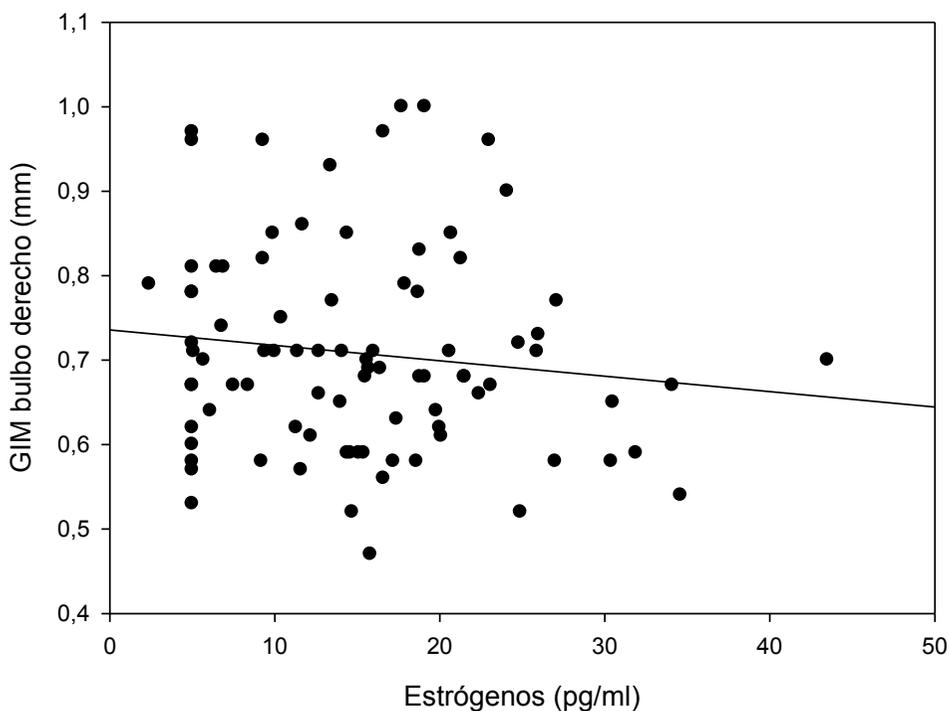


Figura 29. Estudio del GIM del bulbo derecho frente a niveles circulantes de estradiol

5.5 Resumen del resultado estadísticamente significativo del GIM en carótida y bulbo carotídeo

En la tabla 8 se objetiva un resumen de los resultados estadísticamente significativos obtenidos en las distintas regiones anatómicas estudiadas mediante la medición del GIM.

	Carótida Izquierda	Carótida Derecha	Bulbo Izquierdo	Bulbo Derecho
Edad	√	√	√	√
Perímetro Cintura	√			
PCR ultrasensible		√		
Glucosa	√			
Insulina	√			
Estradiol	√	√		√

Tabla 8. Resumen de las variables que de forma independiente mostraron impacto GIM en las distintas zonas anatómicas

5.6 Presencia de placa ateromatosa

5.6.1 Placa calcificada frente a edad

La figura 30 representa la frecuencia de la presencia o no de placa calcificada en función de los distintos grupos de edad. Como queda expuesto, el grupo que prácticamente acumula casi todos los casos con placa detectables es el del intervalo etario de 60-69 años, que es también el más numeroso. Luego, no vuelve a identificarse placa hasta la edad más avanzada, el único caso con intervalo de 80 a 89 años. No hubo ninguna detección en las mujeres de 70 a 79 años, pero dado el bajo número de casos por encima de 70 años, cualquier conclusión aquí debe tomarse con cautela. No obstante, las diferencias fueron estadísticamente significativas entre la presencia de placa en función del aumento de la edad ($p=0,00$).

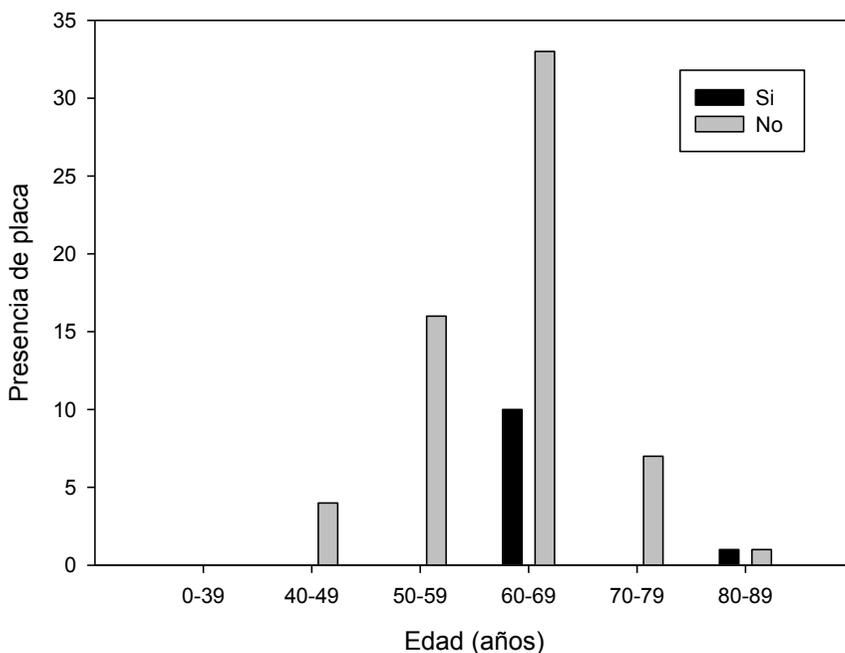


Figura 30. Presencia de placa calcificada en función de los grupos de edad

5.6.2 Placa calcificada frente a perímetro de cintura

La figura 31 representa la frecuencia de la presencia o no de placa calcificada en función de los distintos grupos de perímetro de la cintura. Se puede apreciar que la presencia de placa es evidente en todos los subgrupos estudiados, siendo especialmente prevalente entre los 81 y 100 cm de perímetro de cintura. Los resultados son estadísticamente significativos al realizar el estudio entre el perímetro de la cintura y la presencia o no de placa ateromatosa, con una $p=0,028$.

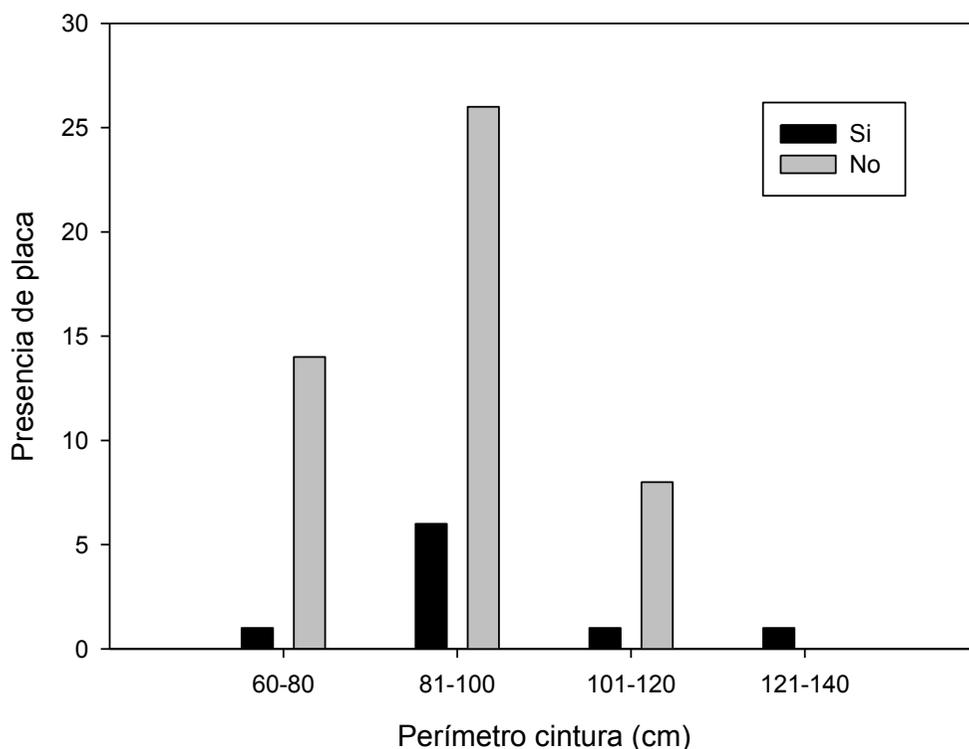


Figura 31. Presencia de placa calcificada en función del perímetro de la cintura

5.6.3 Placa calcificada frente a niveles de estradiol

La figura 32 representa la prevalencia de placa calcificada en función de los distintos estratos de nivel estrogénico. Llama la atención que la presencia de placa calcificada se da en los grupos que presentaban menores niveles séricos de estradiol, siendo especialmente importante la presencia de placa en el grupo de valores comprendidos entre 0 y 20. Estos datos son estadísticamente significativos con una $p=0,033$.

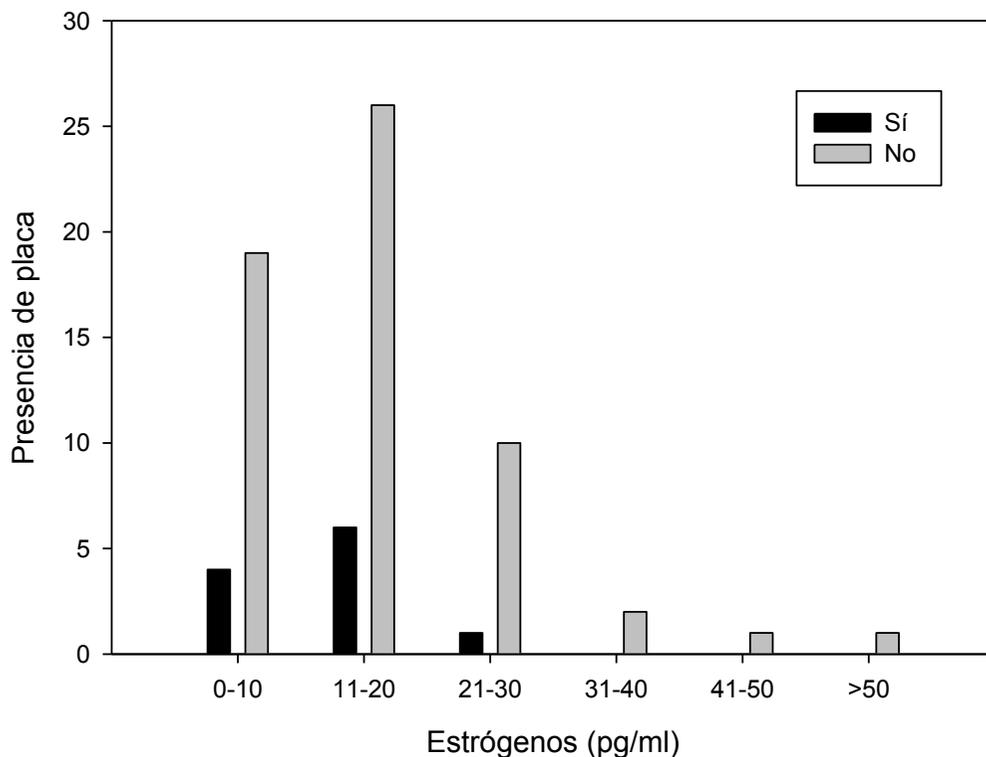


Figura 32. Presencia de placa calcificada en función de los niveles de estradiol

5.7 Resultados de CTC

5.7.1 Score de calcio coronario

La tabla 9 describe los resultados obtenidos para score de calcio coronario (SCC) mediante el estudio tomográfico de las coronarias. Como se puede objetivar, tan solo se ha explorado a 32 mujeres; de ellas, en tan solo 5 se han descrito índices de riesgo superiores a “bajo”, siendo únicamente 1 caso para cada índice de “alto” o “muy alto riesgo”.

Resultado SCC	Nº Mujeres	Riesgo CV
<100	27	Bajo
100-400	3	Moderado
>400-1000	1	Alto
>1000	1	Muy Alto

Tabla 9. Resultados de las Mujeres en el score de calcio coronario

5.7.2 AngioTC de coronarias

Los resultados mostrados tanto en la tabla 10 como en la figura 33 son bastante similares a los obtenidos mediante el estudio del SCC. Se objetiva un gran número de sujetos (la mayoría) sin ninguna lesión significativa en los vasos y un grupo de 6 pacientes (el 19%) que tienen algún tipo de riesgo.

Estenosis Coronaria	Nº Mujeres
No lesiones	26
50%	2
50-70%	1
>70%	3

Tabla 10. Estenosis estudiada mediante AngioTC de coronarias (% estenosis en cualquier coronaria)

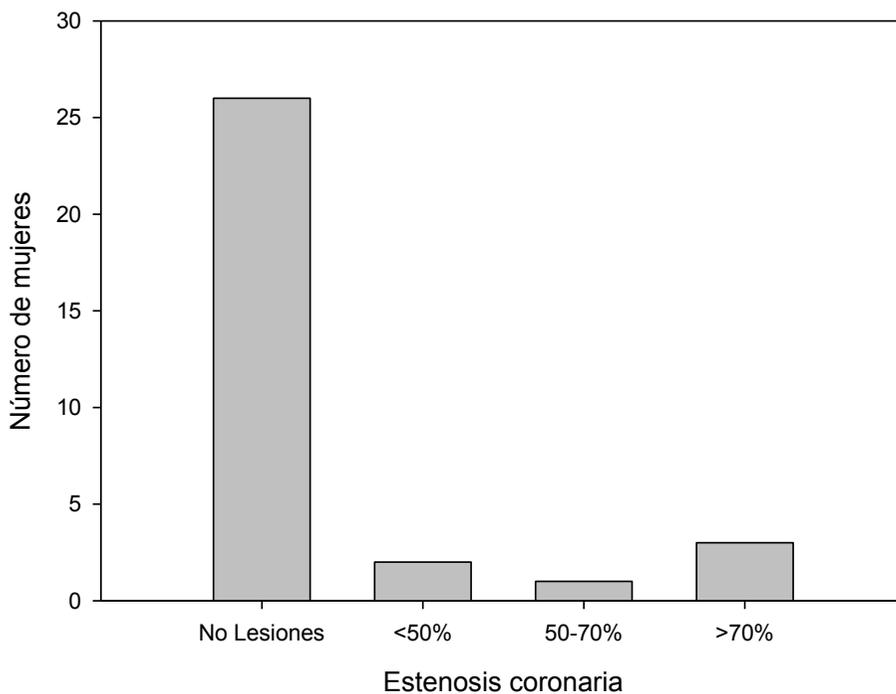


Figura 33. Prevalencia de lesiones coronarias tras el AngioTC coronario

Existen unas pequeñas reclasificaciones de pacientes que modifican su índice de riesgo. Esto es debido a que el estudio angiográfico no invasivo es mucho más detallado y permite valorar tanto las lesiones calcificadas como las que no lo están. Por ello, pacientes que presentaban unas categorías de riesgo pasan a otras. En la Tabla 11 se hace una comparativa global de los resultados de las dos pruebas, mientras que en la tabla 12 se representa qué pacientes han sido reclasificadas en función de la prueba elegida.

Resultado CACS	Nº Mujeres	Riesgo CV	Estenosis Coronaria	Nº Mujeres
<100	27	Bajo	No lesiones	26
100-400	3	Moderado	<50%	2
>400-1000	1	Alto	50<70%	1
>1000	1	Muy Alto	70-100%	3

Tabla 11. Comparativa de los dos gráficas anteriores

Número de pacientes	Riesgo (Score de calcio coronario)	Riesgo AngioTC coronario
2	Bajo	Moderado
2	Moderado	Bajo
1	Moderado	Muy alto
1	Bajo	Muy alto

Tabla 12. Reclasificación de las pacientes en función de la prueba utilizada

Como se puede observar en la tabla 13, la presencia o no de placa en carótida o bulbo parece no tener relación con el riesgo de presentar una lesión coronaria. No obstante, sí que parece identificarse una tendencia en el caso del riesgo cardíaco y el GIM máximo (sin tener en cuenta qué zona anatómica) de las pacientes de las que se dispone de las 4 áreas de estudio.

Paciente	SCC	AngioTC	Placa calcificada	GIM máx	Cuartil (GIM)
1	Bajo	Bajo	√	0,69	Medio
2	Bajo	Bajo	√	1,00	Alto
3	Moderado	Bajo	X	1,00	Alto
4	Bajo	Bajo	√	0,97	Alto
5	Bajo	Bajo	√	0,85	Alto
6	Muy Alto	Muy Alto	X	0,78	Alto
7	Alto	Alto	X	0,81	Alto
8	Moderado	Bajo	X	0,68	Medio
9	Bajo	Muy Alto	X	0,83	Alto
10	Moderado	Muy Alto	X	0,84	Alto
11	Bajo	Bajo	√	0,98	Alto
12	Bajo	Bajo	X	0,92	Alto

Tabla 13. Resultados de las pacientes con algún tipo de riesgo en alguna de las pruebas que presentaban resultados para las 4 áreas a estudio

5.8 Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs)

5.8.1 Receptores estrogénicos beta (rs4986938)

5.8.1.1 rs4986938 frente a GIM de carótida derecha

Como se puede objetivar en la gráfica, se han obtenido resultados estadísticamente significativos al realizar el estudio entre el receptor beta estrogénico (rs4986938) con el grosor de la íntima-media de la carótida derecha, con una $p=0,040$.

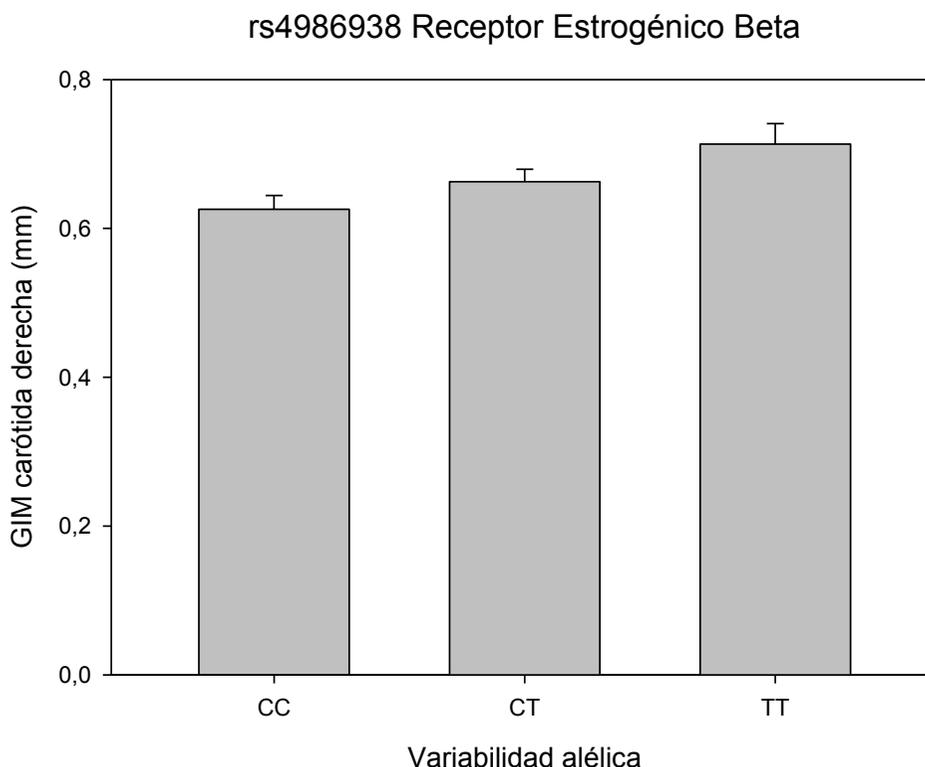


Figura 34. Representación de la variabilidad alélica en relación al GIM de la carótida derecha

5.8.2 Receptores Vitamina D (rs11568820)

5.8.2.1 rs11568820 frente a GIM de carótida izquierda

Para el estudio del receptor de Vitamina D (rs11568820), también se han obtenido resultados estadísticamente significativos al cruzarlo con el GIM de la carótida izquierda, obteniendo unos valores con una $p=0,025$.

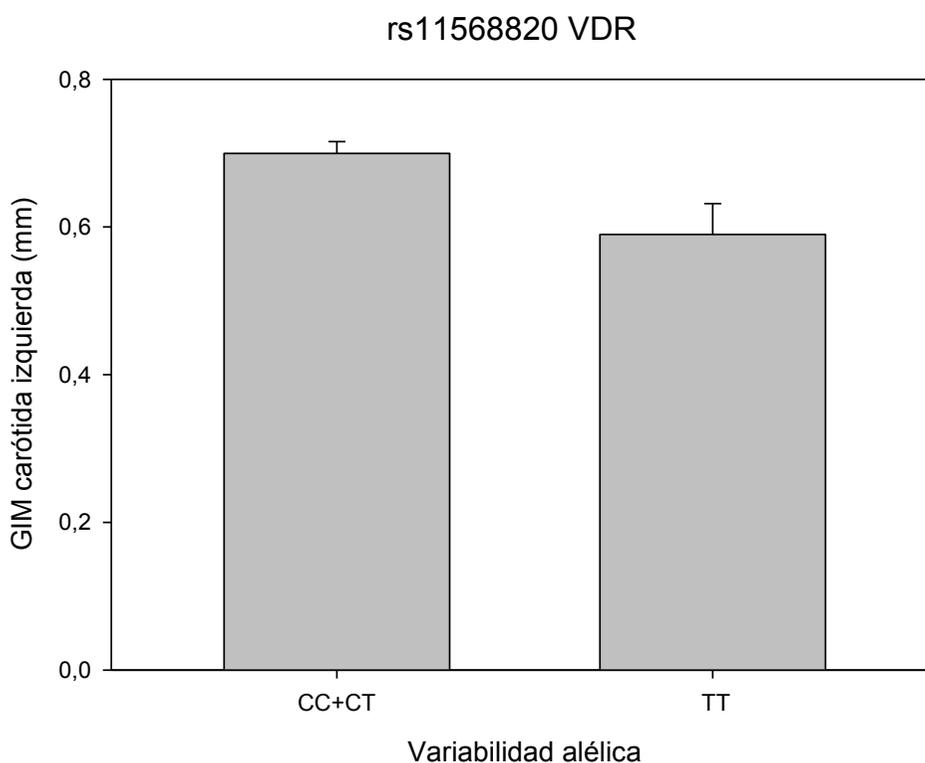


Figura 35. Representación de la variabilidad alélica en relación al GIM de la carótida izquierda

6. DISCUSIÓN

Nuestro trabajo ha pretendido explorar un período clave en el desarrollo de la ECV de la mujer, el que se centra en los años que siguen a la menopausia. Es ahí donde se desarrollan las lesiones ateromatosas que van a constituir el sustrato de la enfermedad, y que definen la ventana en la que hay margen de actuación para desencadenar prevención primaria. Conocer mejor este período es considerado crucial en la actualidad, y ahí por tanto decidimos concentrar nuestro esfuerzo cuando se diseñó el presente trabajo.

Siendo este período importante, es llamativo que ha sido poco investigado. Para ello, hemos seleccionado a un grupo de mujeres que, en un cierto abanico de edad, se mueven con estas características. Hemos querido que el abanico etario sea algo amplio a fin de asegurar que captamos los momentos clave de ese período. Una vez cumplido este requisito, hemos incluido para ello biomarcadores de imagen, es decir, indicadores que a priori resultan ser excelentes candidatos para detectar procesos ateromatosos ya en marcha, y nos hemos focalizado en dos territorios clave, la carótida y las coronarias. Ya asegurada una captación de datos con estas tecnologías, hemos añadido un exhaustivo análisis de factores de riesgo clínicos y analíticos, que hemos contrastado con los biomarcadores de imagen.

Finalmente, y no menos importante, hemos investigado qué papel pueden tener los estrógenos en este contexto, a fin de ampliar la información sobre su implicación en la protección frente a la aterogénesis, una cuestión de primer nivel de importancia y sobre la que hay un tremendo debate en la literatura y entre los investigadores. Niveles circulantes de estrógenos y variantes polimórficas en genes implicados en la acción estrogénica han sido integrados a fin de responder a esta cuestión. Todo ello lo hemos

incorporado en un estudio sobre una población de mujeres no seleccionadas por un perfil específico de enfermedad y con un diseño cruzado.

La estructuración de este apartado se ha hecho en función del fenotipo de las pruebas de imagen. Antes de ello se van a hacer, no obstante, algunas consideraciones de orden metodológico.

6.1 Consideraciones metodológicas

Es importante subrayar la consistencia de las exploraciones incluidas en el estudio. Como a continuación se describe, los datos resultan de la colaboración de un equipo multidisciplinar de especialistas, que han hecho posible integrar datos variados a partir de un único colectivo que presenta las características singulares, género y edad, que ya se han descrito.

En tal sentido, las determinaciones analíticas se han hecho siempre en el mismo laboratorio, con procedimientos que no han cambiado, y sobre una base de automatismo absoluto, lo que evita los errores derivados de la manipulación humana.

En cuanto al estudio genómico, las muestras de ADN han sido también manipuladas en condiciones estandarizadas, sin modificaciones de procedimiento, y en un laboratorio experimentado, como es el del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina, y con los grandes equipos del Instituto de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia (INCLIVA). Se trata de un laboratorio experimentado, que en este campo es dirigido por genetistas líderes en tecnología genómica avanzada, como demuestra su currículum investigador.

Finalmente, las pruebas de imagen han sido realizadas de acuerdo a estándares de calidad contrastados. La valoración del GIM se ha hecho con el mismo ecógrafo y por el mismo investigador, siempre de acuerdo a las normas de exploración emitidas por asociaciones científicas internacionales, como es la Asociación Americana del Corazón (AHA, American Heart

Association). La valoración coronaria se ha realizado en un centro experimentado, como es el de ERESA-Hospital General Universitario de Valencia, con cardiólogos especialistas en imagen cardíaca y con tecnología de CTC capaz de detectar lesiones precoces en el territorio coronario. Todos estos extremos han sido descritos con detalle en la sección de Métodos.

6.2 Valoración del GIM y de la presencia de placa calcificada en carótidas y bulbo:

Un rasgo llamativo ha sido el mayor potencial discriminativo de la exploración en la carótida común que en el bulbo. Así y todo, las variables que han resultado significativamente asociadas con GIM en bulbo, la edad fundamentalmente y, con una fuerte tendencia el estradiol y los años desde menopausia, se han reproducido en carótida común. La carótida común, por su parte, ha revelado además una asociación significativa con otras variables, el perímetro de la cintura y glucosa-insulina entre los factores de riesgo, y la PCR ultrasensible entre los biomarcadores. El papel de los estrógenos sale reforzado, por su parte, como consecuencia de los datos genómicos.

Comentaremos por separado cada una de las variables.

6.2.1 Edad

La asociación con la edad tiene un interés especial. Se trata de un hallazgo acorde a lo descrito en mucho de lo publicado hasta la fecha, de suerte que actúa por tanto como factor de confirmación de la consistencia de nuestros datos. Esta asociación tiene relevancia desde la perspectiva del análisis de la historia natural de la aterosclerosis. Como se ha descrito con anterioridad, la enfermedad se inicia desde edad temprana. Evoluciona en el tiempo con afectación endotelial en las fases iniciales y sufre un proceso de reparación continuo. El tiempo, por tanto, determina una acumulación de procesos de lesión-reparación, que forman la base para el desarrollo de placas iniciales. Las placas adquieren los fenotipos propios de formas más avanzadas, en un

proceso donde hay factores moduladores, como son el género, los estilos de vida, la susceptibilidad genética, y otros.

De acuerdo con ello, la asociación encontrada otorga consistencia a nuestros datos, y a la vez confirma que nuestros sistemas de exploración son capaces de discriminar adecuadamente, incluso en edades en las que las lesiones son todavía lo suficientemente tempranas como para no condicionar riesgo inmediato.

También de interés, la potencia de esta asociación se confirma por la aparición en la exploración de los dos territorios, carótida común y bulbo. Esto es interesante, pues las turbulencias de flujo en el bulbo le definen a priori como un territorio particularmente susceptible a la generación de lesiones endoteliales y a la aparición de placa. La acción de cizallamiento esperable en los acodamientos ha sido muy estudiada, de suerte que la potencia del flujo ejerce un efecto de regulación endotelial mediada por factores mecánicos. El endotelio actúa como una interfase que genera una serie de señales en respuesta a las fuerzas hemodinámicas. Descrito en la literatura internacional como “mechanotransduction”, el proceso condiciona activación de canales iónicos y dinámica de proteínas del citoesqueleto, que convierten a estos puntos como lugares de desarrollo preferencial de placa (117) (figura 36).

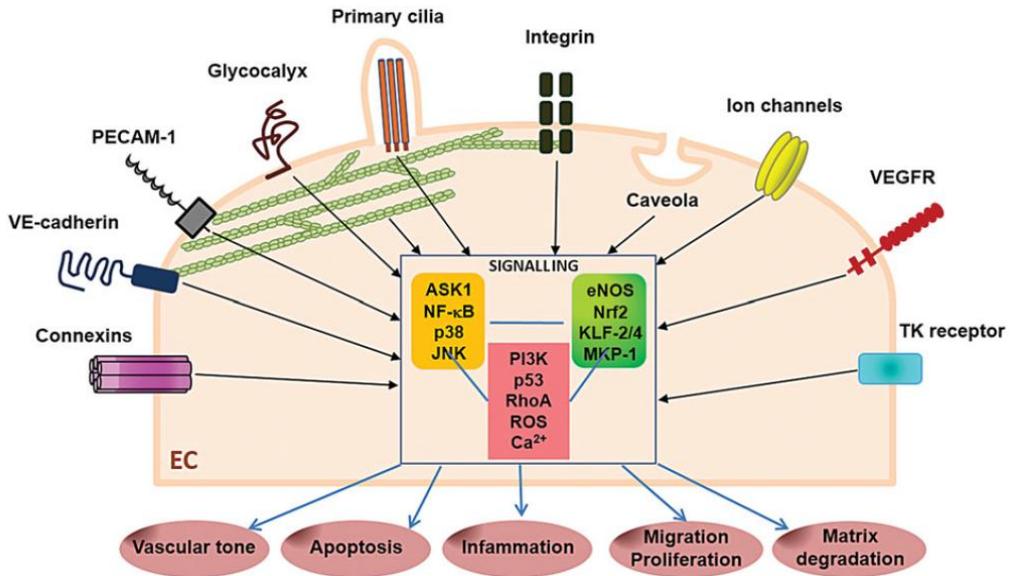


Figura 36. Mecanorreceptores y señalización intracelular del endotelio arterial. Representación esquemática de una variedad de moléculas asociadas a la membrana y a los microdominios que se cree que afectan al endotelio, convirtiendo señales mecánicas en químicas

Estas diferencias no han sido detectadas en el intervalo vital representado por nuestra cohorte, lo que puede obedecer a varios factores, tales como el mencionado intervalo de edad, la peculiaridad impuesta por el género femenino, o bien las propias características de la potencia del flujo en la carótida, que tiene entidad suficiente como para suponer unas características de cizallamiento no alejadas de las encontradas en el bulbo. A todo ello es preciso añadir el resultado obtenido al relacionar los años desde la menopausia con el GIM. Bien es cierto que los resultados no son estadísticamente significativos ($p=0,055$), pero se aproximan lo suficiente como para evidenciar una tendencia clara similar al comportamiento de edad respecto al GIM en las distintas zonas anatómicas estudiadas. Por todo

ello, estos datos son generadores de hipótesis e incitan a estudiar más a fondo con una población mayor.

6.2.2 Estrógenos

Nuestros datos muestran que el nivel circulante de estradiol se relaciona con el GIM. Más aún, el estudio de polimorfismos de los genes de los receptores estrogénicos beta y de la aromatasa muestran que hay asociación entre los datos de imagen y ciertas formas polimórficas. Por tanto, no sólo los niveles circulantes, sino la sensibilidad tisular, están enmarañados con el conjunto de factores que crean diferencias entre las mujeres para la susceptibilidad a la aterosclerosis.

Esto es de mucho interés, pues enlaza con varios estudios en la literatura que se han planteado un objetivo similar. Como se ha descrito en la introducción, hay multitud de bibliografía describiendo el impacto de los estrógenos en la salud endotelial, con resultados no siempre compatibles.

Actualmente hay dos grandes planteamientos. El primero se focaliza en la acción de la reposición con estrógenos en la mujer postmenopáusica. Tras diversos estudios de observación demostrando beneficio, los estudios aleatorizados de más entidad encontraron que la protección no se producía, y que incluso había incremento de riesgo cuando la reposición se llevaba a efecto en mujeres de edad avanzada(16). La matización sobre la edad avanzada es importante. Además, posteriormente ha habido puntualizaciones adicionales, en función de si se asocian o no progestágenos al tratamiento (118), o el tipo de estrógenos usado (119). Como resultado de ello, se postula que el efecto es neutro o incluso se asocia, en línea con lo sostenido en el pasado, con beneficio frente a la ECV (120).

Pero todo esto se refiere, como hemos dicho, a la administración de estrógenos exógenos. El segundo de los planteamientos intenta detectar si el nivel de estrógenos circulantes, siempre bajo obviamente por tratarse de mujeres postmenopáusicas, puede asociarse con cierto nivel de protección. La diferencia de este planteamiento es que aquí no hay estrógenos exógenos en juego, ni entran en consideración mecanismos que puedan ponerse en marcha por potenciales efectos farmacológicos, o asociados a la vía de administración, etc.

Este segundo planteamiento es el de nuestro estudio, que en tal sentido presenta valor, pues hay menos datos en la literatura, particularmente con nuestro perfil de mujeres en edad susceptible y sin riesgo especial aparente. Los datos que se han publicado presentan cierta variedad. De hecho, un reciente estudio caso-control en mujeres con enfermedad arterial isquémica encontró aumento de riesgo con el nivel circulante de estrógenos, si bien sólo en ciertas variantes genotípicas relacionadas con el receptor de estrógenos (121), pero una revisión sistemática es, reconociendo las limitaciones impuestas por la ausencia de datos, acorde a nuestros resultados (122).

Como consecuencia, hemos de considerar que el efecto de niveles bajos pero sostenidos, sin potencial para inducir proteínas hepáticas implicadas en la trombogénesis, y sin variantes moleculares que puedan inducir efectos diferenciales a nivel de los receptores estrogénicos de la pared vascular, determinarían cambios acordes a lo descrito en estudios de intervención, experimentales y muchos de los clínicos, disponibles en la actualidad. Si hay o no un efecto sobre lípidos circulantes es menos claro a las concentraciones que encontramos en estas mujeres. Tampoco está claro si hay efecto sobre la sensibilidad a la insulina, a tenor de nuestros datos con el índice HOMA

(123, 124). También de interés, los niveles circulantes se asociaron con reducción en los niveles de PCR, subrayando de esa forma los efectos antiinflamatorios y vasculoprotectores de los estrógenos en la mujer (125-128).

6.2.3 Perímetro de cintura

Un dato de mucho interés en nuestro estudio es la asociación estadísticamente significativa del perímetro de cintura con la presencia o no de placas y, específicamente, en la carótida izquierda. Este hallazgo reproduce en nuestra cohorte, donde procede recordar de nuevo su perfil femenino y de edad temprana, el impacto de un factor de riesgo detectado en estudios de asociación que incluyen episodios clínicos. De nuevo, esta asociación añade consistencia a los resultados obtenidos en nuestro estudio. Esta asociación tiene particular importancia al tratarse de mujeres, pues junto a los cambios en lípidos, el otro rasgo confirmado en estudios observacionales, transversales y longitudinales, sobre el impacto de la menopausia en la mujer, surge el cambio en la arquitectura corporal (14, 129).

La acumulación de grasa en la cintura, con un patrón masculino, ha sido atribuida a múltiples factores. Uno de ellos es hormonal. La menopausia en sí condiciona una reorganización de la grasa de la mujer como consecuencia de un incremento en los niveles de testosterona libre, tal y como se ha encontrado en análisis de regresión múltiple (130). La caída en los niveles de estrógenos se ha considerado como factor determinante en este aumento en la fracción libre de testosterona. El aumento del perímetro de la cintura se encuentra altamente relacionado con el síndrome metabólico, en el que

se incluye un aumento del colesterol total (con aumento de las LDLs y disminución de las HDLs) (14). También se le relaciona con el aumento de la resistencia insulínica, que en nuestro análisis ha emergido también como factor independiente asociado significativamente con el incremento del GIM en carótida. Por tanto, el impacto del perímetro de cintura en nuestra cohorte está condicionado también por otros factores, sobre los que solamente podemos especular.

Uno de estos factores puede ser el descenso de actividad física. A estas edades baja significativamente la actividad, con aumento del sedentarismo. Este hallazgo se reproduce de manera persistente a escala mundial (131). La obesidad lleva implícitos una serie de cambios analíticos que se encuentran muy relacionados con el incremento en el riesgo vascular. El papel de ciertas adipoquinas, por ejemplo, está bien establecido (132). Junto a ello, los adipocitos de la grasa central se han implicado en multitud de mecanismos paracrinos y endocrinos que han sido implicados en inflamación, disfunción endotelial, amén de un desequilibrio desfavorable en la producción de adipokinas, como se señala anteriormente (133). Es posible que algunos de ellos tengan impacto detectable por técnicas de imagen tanto en carótidas como en coronarias.

6.2.4 Glucemia e insulinemia

La estrecha relación entre los niveles de glucosa e insulina, expresada en el índice HOMA, nos lleva a contemplar el análisis de ambos factores en su conjunto.

La insulina ha sido considerada como un auténtico factor de riesgo cardiovascular (134-136). Y ello es por su conocido papel favorecedor de la calcificación parietal de las arterias, y específicamente de las coronarias

(136). Estos hallazgos son congruentes con las publicaciones que defienden que el efecto de la glucosa y su metabolismo afecta de forma generalizada a la arteriosclerosis, no centrándose exclusivamente en los eventos cardíacos. Es difícil separar las acciones del dúo glucosa/insulina de las ya comentadas para la obesidad central. El análisis de nuestros datos otorga responsabilidad específica a las primeras, además del impacto que ofrece per se la segunda.

6.2.5 Marcadores de inflamación (PCR ultrasensible)

Puesto que la aterosclerosis es considerada una enfermedad inflamatoria, es esperable que se asocie a aumentos en los niveles circulantes de PCR. Estudios observacionales con alto número de participantes han confirmado la asociación. Sin embargo, no se ha consolidado como un marcador de entidad suficiente como para discriminar individuos susceptibles en la clínica. Por otro lado, la asociación se ha establecido en población americana, donde la prevalencia de la ECV es considerablemente más alta que en nuestro país. Por ese motivo tiene especial interés inspeccionar nuestros resultados al respecto.

La cuantificación de PCR ultrasensible en suero ha demostrado utilidad para monitorizar la progresión de enfermedades y la eficacia de tratamientos en distintas formas de las mismas. Como marcador de riesgo de aterosclerosis ha mostrado gran estabilidad, pero con valores que cambian según factores étnicos, como demuestra el estudio SWAN en mujeres norteamericanas de diversos orígenes étnicos (137). De particular interés, la PCR ha mostrado una especialización por la aterosclerosis de carótida, de suerte que se ha sugerido un papel activo de la PCR en el desarrollo de placas carotídeas y en la progresión de la enfermedad ateromatosa carotídea (138). Constituye por

tanto el biomarcador de inflamación ideal frente a esta variante regional de aterosclerosis.

No está claro si otros marcadores de inflamación podían haber resultado más discriminativos. Hay varios en la literatura, por ejemplo, la interleukina 6, la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 [monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)], u otros. Pero los datos clínicos en la bibliografía internacional son escasos, y los datos de nuestro entorno aún más. En nuestra población hay más experiencia con factores de riesgo tipo lípidos, hipertensión, tabaco, o cualquiera de los denominados factores de riesgo “potentes”.

6.2.6 Vitamina D

Nuestro estudio presenta como rasgo interesante la información sobre los niveles de vitamina D en las mujeres exploradas. Esto tiene el interés de poder evaluar su impacto como indicador frente a otros factores de riesgo analíticos o de imagen. En la literatura hay una pléyade de publicaciones que analizan el papel de la vitamina D como indicador de riesgo, y los resultados no son siempre uniformes (139-143).

En nuestra serie existe una relación estadísticamente significativa entre el GIM de la carótida común izquierda y el receptor específico de Vitamina D. Dada la escasa muestra del estudio, esto sugiere que con un estudio de mayores dimensiones, se pueda obtener resultados muy interesantes. Los mecanismos potenciales por los cuales la vitamina D puede modular la progresión de la arteriosclerosis han sido investigados por diversos autores. Por ejemplo, se ha descrito que la vitamina puede afectar la función endotelial, de suerte que los niveles bajos se asocian a una fisiología

deteriorada del endotelio en mujeres premenopáusicas sin patología e, interesante, que la intervención suplementando por sólo 6 meses se sigue de una mejora palpable, evaluada por mejora de la dilatación mediada por flujo y por un incremento en células progenitoras endoteliales en circulación (143). Igualmente, los niveles de vitamina D se han asociado con los de PCR en individuos jóvenes y niños con lupus (142), lo que apoya un papel también en los procesos inflamatorios subyacentes a la propia arteriosclerosis. Nuestro estudio va más allá, pues presenta asociación con variantes alélicas del receptor de Vitamina D, lo que constituye una novedad a resaltar. Curiosamente, esta asociación no se ha dado en el caso del estudio del GIM en ninguno de los territorios del eje carotídeo con los valores analíticos de la vitamina.

Contrariamente a lo descrito por el estudio genético, algunos autores no han encontrado relación alguna entre la evolución de la aterosclerosis y su asociación a la vitamina D. Así lo muestra una revisión sistemática de 7 estudios (139). Como describen los autores, la evidencia es insuficiente para pronunciarse, pues los estudios incluyen muestras cortas, no ajustan para factores de confusión y emplean niveles de corte para considerar niveles bajos de vitamina D que son inconsistentes. Frente a todo ello, el nuestro no analiza variaciones alélicas específicas de receptores de Vitamina D en relación al GIM carotídeo.

El efecto de la vitamina D en la arteriosclerosis precisa de investigación más profunda. De hecho, algunos investigadores encuentran que tanto el déficit como el exceso de la misma son perjudiciales para la evolución de la arteriosclerosis. En tal sentido, el amplio abanico de variables incluido en nuestro estudio puede aportar valor por cuanto otros parámetros relacionados con la enfermedad son analizados en la misma cohorte. El

perfil de todas las participantes, de acuerdo al progresivo descenso que se ha descrito con la edad, presentaron niveles considerados por debajo de los niveles óptimos (ver figura 17 en la sección de Resultados [Vit D]).

6.3 Cardiotomografía computerizada (score de calcio y angioTC coronario)

El siguiente apartado corresponde a los estudios de imagen de CTC. Su gran ventaja es que aportan datos del territorio coronario, y por tanto nos relacionaría más directamente con la aterosclerosis en este territorio, más prevalente y más impactante desde el punto de vista clínico. Por el contrario, se trata de estudios con exposición a la radiación, que es un elemento a tener en cuenta al valorar el riesgo-beneficio. En cualquier caso, el bajo número de estudios en mujeres con esta técnica (CTC) no nos permite concluir nada, pues apenas se cuenta con 6 casos de riesgo significativo, pero sí para valorar las diferencias entre las dos pruebas y cómo algunas pacientes pueden llegar a ser reclasificadas en los distintos grupos de riesgo en función a la prueba a la que se sometan. Como se describe con anterioridad, el CACS realiza una cuantificación de la presencia total de calcio en las arterias coronarias; mientras que el AngioTC coronario realiza un estudio más exhaustivo de las estenosis reales que se encuentran en los vasos, valorando tanto las lesiones calcificadas como las que no lo son.

Una vez analizados todos estos datos, debemos tener en cuenta el marco común de los distintos mecanismos diagnósticos aquí propuestos y su carácter preventivo.

Por tanto, consideramos que cada uno de los métodos de imagen ha mostrado utilidad en un campo concreto en función de cuál se valore.

Mientras unos son más específicos para una patología (como la ecografía de carótidas para el ictus o la CTC [SCC y angioTC coronario] para los eventos cardíacos), otros nos permiten realizar una valoración mucho más precisa de la patología ya establecida (grado de estenosis concreto de las arterias coronarias).

7. CONCLUSIÓN

A la luz de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La edad se comportó como el principal factor de riesgo para la presencia de aterosclerosis incipiente o en grado moderado en la mujer.
- Los estrógenos demostraron un potencial modulador sobre los parámetros medidos en carótida.
- El impacto de los estrógenos se confirmó para los niveles circulantes y para las variantes de polimorfismo de nucleótido simple en el receptor beta.
- El grosor íntima-media de carótida común, en una u otra carótida, presentó asociación estadística significativa con otros factores de riesgo tradicionales, concretamente, perímetro de cintura, glucemia, insulinemia, PCR ultrasensible y vitamina D.
- Hubo cierta heterogeneidad en el comportamiento del grosor íntima-media según la región anatómica, de forma que en general, el bulbo carotídeo las presentó con menos frecuencia que la carótida común.
- De igual forma, la presencia o no de placa ateromatosa en la región carotídea otorgó menor precisión que el estudio del grosor íntima-media en la misma región anatómica.

La aterosclerosis coronaria emergió como un parámetro probablemente más tardío que los cambios en carótida. Eso explica que en nuestra cohorte, constituida por mujeres sin factores de riesgo y en un intervalo de edad limitado, las lesiones detectadas fueran escasas. Aunque eso permitió cierta

reclasificación de pacientes, los datos no permitieron establecer potenciales asociaciones con los factores de riesgo evaluados.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Pappa T, Alevizaki M. Endogenous sex steroids and cardio- and cerebro-vascular disease in the postmenopausal period. *Eur J Endocrinol.* 2012 Aug;167(2):145-56.
2. Cury RC, Techasith T, Feuchtner G, Dabus G. Cardiovascular disease and stroke in women: role of radiology. *AJR Am J Roentgenol.* 2011 Feb;196(2):265-73.
3. Solimene MC. Coronary heart disease in women: a challenge for the 21st century. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(1):99-106.
4. Arteriosclerosis SEd. <http://www.searteriosclerosis.org>. [cited]; Available from.
5. Rayner M PS. European cardiovascular disease statistics. 2000 [updated 2000; cited]; British Heart Foundation Health Promotion Research Group]. Available from: <http://www.cardiov.ox.ac.uk/>.
6. Association AH. Heart Disease and Stroke Statistics. [2003; cited]; Available from: www.strokeassociation.org.
7. Rumack CM. The extracranial Cerebral Vessels. *Diagnostic Ultrasound.* 3rd ed: Mosby/Elsevier; 2005. p. 943-91.
8. Wenger NK. You've come a long way, baby: cardiovascular health and disease in women: problems and prospects. *Circulation.* 2004 Feb 10;109(5):558-60.
9. Sai AJ, Gallagher JC, Fang X. Effect of hormone therapy and calcitriol on serum lipid profile in postmenopausal older women: association with estrogen receptor-alpha genotypes. *Menopause.* 2011 Oct;18(10):1101-12.
10. Nogueira-de-Souza NC, Guerreiro da Silva ID, Carvalho CV, Pulchinelli A, Haidar MA, Baracat EC, et al. Effect of estrogen receptor-alpha (ESR1) gene polymorphism on high density lipoprotein levels in response to

hormone replacement therapy. *Braz J Med Biol Res.* 2009 Dec;42(12):1138-42.

11. Knowlton AA. Estrogen and cardiovascular disease: aging and estrogen loss at the heart of the matter? *Future Cardiol.* 2012 Jan;8(1):9-12.

12. Perez-Lopez FR, Larrad-Mur L, Kallen A, Chedraui P, Taylor HS. Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences. *Reprod Sci.* 2012 Jun;17(6):511-31.

13. Mesch VR, Siseles NO, Maidana PN, Boero LE, Sayegh F, Prada M, et al. Androgens in relationship to cardiovascular risk factors in the menopausal transition. *Climacteric.* 2008;11(6):509-17.

14. Matthews KA, Crawford SL, Chae CU, Everson-Rose SA, Sowers MF, Sternfeld B, et al. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? *J Am Coll Cardiol.* 2009 Dec 15;54(25):2366-73.

15. Matthews KA, Abrams B, Crawford S, Miles T, Neer R, Powell LH, et al. Body mass index in mid-life women: relative influence of menopause, hormone use, and ethnicity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 Jun;25(6):863-73.

16. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA.* 2007 Apr 4;297(13):1465-77.

17. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26.

18. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994 May 19;330(20):1431-8.

19. Anggard EE. The endothelium--the body's largest endocrine gland? *J Endocrinol.* 1990 Dec;127(3):371-5.

20. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):310-8.
21. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992 Jan 23;326(4):242-50.
22. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*. 1993 Jul;49(3):566-76.
23. Zwijsen RM, Japenga SC, Heijen AM, van den Bos RC, Koeman JH. Induction of platelet-derived growth factor chain A gene expression in human smooth muscle cells by oxidized low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Aug 14;186(3):1410-6.
24. Falk E. [Plaque vulnerability and disruption]. *Rev Clin Esp*. 1996 Dec;196(4 Monografico):6-12.
25. Badimon JJ, Zaman A, Helft G, Fayad Z, Fuster V. Acute coronary syndromes: pathophysiology and preventive priorities. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):997-1004.
26. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1579-85.
27. Napoli C. MMP inhibition and the development of cerebrovascular atherosclerosis: The road ahead. *Stroke*. 2002 Dec;33(12):2864-5.
28. Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, et al. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3024-30.

29. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res.* 2002 Nov 1;91(9):852-9.
30. Huck V, Schneider MF, Gorzelanny C, Schneider SW. The various states of von Willebrand factor and their function in physiology and pathophysiology. *Thromb Haemost.* Apr 1;111(4):598-609.
31. Swieringa F, Kuijpers MJ, Heemskerk JW, van der Meijden PE. Targeting platelet receptor function in thrombus formation: the risk of bleeding. *Blood Rev.* Jan;28(1):9-21.
32. Cano A, Van Baal WM. The mechanisms of thrombotic risk induced by hormone replacement therapy. *Maturitas.* 2001 Oct 31;40(1):17-38.
33. Bushnell CD. Stroke in women: risk and prevention throughout the lifespan. *Neurol Clin.* 2008 Nov;26(4):1161-76, xi.
34. Yamamoto FI. Ischemic stroke in young adults: an overview of etiological aspects. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012 Jun;70(6):462-6.
35. Meier B, Frank B, Wahl A, Diener HC. Secondary stroke prevention: patent foramen ovale, aortic plaque, and carotid stenosis. *Eur Heart J.* 2012 Mar;33(6):705-13, 13a, 13b.
36. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, et al. Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Engl J Med.* 2002 Nov 21;347(21):1713-6.
37. Bronner LL, Kanter DS, Manson JE. Primary prevention of stroke. *N Engl J Med.* 1995 Nov 23;333(21):1392-400.
38. Reed DM. The paradox of high risk of stroke in populations with low risk of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* 1990 Apr;131(4):579-88.

39. Tonelli M, Lloyd A, Clement F, Conly J, Husereau D, Hemmelgarn B, et al. Efficacy of statins for primary prevention in people at low cardiovascular risk: a meta-analysis. *CMAJ*. Nov 8;183(16):E1189-202.
40. Straus SE, Majumdar SR, McAlister FA. New evidence for stroke prevention: scientific review. *JAMA*. 2002 Sep 18;288(11):1388-95.
41. D'Agostino RB, Wolf PA, Belanger AJ, Kannel WB. Stroke risk profile: adjustment for antihypertensive medication. The Framingham Study. *Stroke*. 1994 Jan;25(1):40-3.
42. Sachdeva A, Cannon CP, Deedwania PC, Labresh KA, Smith SC, Jr., Dai D, et al. Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: an analysis of 136,905 hospitalizations in Get With The Guidelines. *Am Heart J*. 2009 Jan;157(1):111-7 e2.
43. Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med*. 2000 Oct 19;343(16):1179-82.
44. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000 Mar 23;342(12):836-43.
45. Madjid M, Willerson JT. Inflammatory markers in coronary heart disease. *Br Med Bull*. 2011;100:23-38.
46. Albrecht T, Blomley MJ, Burns PN, Wilson S, Harvey CJ, Leen E, et al. Improved detection of hepatic metastases with pulse-inversion US during the liver-specific phase of SHU 508A: multicenter study. *Radiology*. 2003 May;227(2):361-70.
47. Ruchala M, Szczepanek E. [Thyroid ultrasound - a piece of cake?]. *Endokrynol Pol*. 2011;62 Suppl 1:8-24.

48. Wilson DJ, Parada SA, Slevin JM, Arrington ED. Intrasubstance ruptures of the biceps brachii: diagnosis and management. *Orthopedics*. 2011 Nov;34(11):890-6.
49. Linhart A, Garipey J, Giral P, Levenson J, Simon A. Carotid artery and left ventricular structural relationship in asymptomatic men at risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 1996 Nov 15;127(1):103-12.
50. Donald I, Macvicar J, Brown TG. Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. *Lancet*. 1958 Jun 7;1(7032):1188-95.
51. Memel DS, Dodd GD, 3rd, Esola CC. Efficacy of sonography as a guidance technique for biopsy of abdominal, pelvic, and retroperitoneal lymph nodes. *AJR Am J Roentgenol*. 1996 Oct;167(4):957-62.
52. Khati NJ, Gorodenker J, Hill MC. Ultrasound-guided biopsies of the abdomen. *Ultrasound Q*. 2011 Dec;27(4):255-68.
53. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Sr. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2011 Jul 21;365(3):213-21.
54. Touboul PJ, Vicaut E, Labreuche J, Belliard JP, Cohen S, Kownator S, et al. Design, baseline characteristics and carotid intima-media thickness reproducibility in the PARC study. *Cerebrovasc Dis*. 2005;19(1):57-63.
55. El Khoudary SR, Wildman RP, Matthews K, Thurston RC, Bromberger JT, Sutton-Tyrrell K. Progression rates of carotid intima-media thickness and adventitial diameter during the menopausal transition. *Menopause*. 2013 Jan;20(1):8-14.
56. 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. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008 Feb;21(2):93-111; quiz 89-90.

57. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986 Dec;74(6):1399-406.

58. Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke*. 2007 Oct;38(10):2698-705.

59. Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Feb;30(2):177-81.

60. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Dec 14;56(25):e50-103.

61. 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 Apr 1;70(14):1200-7.

62. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*. 1998 Feb 15;128(4):262-9.

63. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation*. 1993 Mar;87(3 Suppl):II56-65.

64. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol.* 1997 Sep 15;146(6):483-94.
65. 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 Sep 2;96(5):1432-7.
66. Blumenthal RS, Michos ED. The HALTS trial--halting atherosclerosis or halted too early? *N Engl J Med.* 2009 Nov 26;361(22):2178-80.
67. Sharma K, Blaha MJ, Blumenthal RS, Musunuru K. Clinical and research applications of carotid intima-media thickness. *Am J Cardiol.* 2009 May 1;103(9):1316-20.
68. 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 Jan 7;340(1):14-22.
69. Folsom AR, Chambless LE, Duncan BB, Gilbert AC, Pankow JS. Prediction of coronary heart disease in middle-aged adults with diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Oct;26(10):2777-84.
70. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007 Jan 30;115(4):459-67.
71. Iglesias del Sol A, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Witteman JC. Carotid intima-media thickness at different sites: relation to incident

myocardial infarction; The Rotterdam Study. *Eur Heart J.* 2002 Jun;23(12):934-40.

72. Rosvall M, Janzon L, Berglund G, Engstrom G, Hedblad B. Incident coronary events and case fatality in relation to common carotid intima-media thickness. *J Intern Med.* 2005 May;257(5):430-7.

73. Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke.* 2006 Jan;37(1):87-92.

74. Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharrett AR, Shahar E, Nieto FJ, et al. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol.* 2000 Mar 1;151(5):478-87.

75. Hollander M, Hak AE, Koudstaal PJ, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, et al. Comparison between measures of atherosclerosis and risk of stroke: the Rotterdam Study. *Stroke.* 2003 Oct;34(10):2367-72.

76. Kitamura A, Iso H, Imano H, Ohira T, Okada T, Sato S, et al. Carotid intima-media thickness and plaque characteristics as a risk factor for stroke in Japanese elderly men. *Stroke.* 2004 Dec;35(12):2788-94.

77. Rosvall M, Janzon L, Berglund G, Engstrom G, Hedblad B. Incidence of stroke is related to carotid IMT even in the absence of plaque. *Atherosclerosis.* 2005 Apr;179(2):325-31.

78. Newman AB, Naydeck BL, Ives DG, Boudreau RM, Sutton-Tyrrell K, O'Leary DH, et al. Coronary artery calcium, carotid artery wall thickness, and cardiovascular disease outcomes in adults 70 to 99 years old. *Am J Cardiol.* 2008 Jan 15;101(2):186-92.

79. 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. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 13;55(15):1600-7.
80. Bechlioulis A, Kalantaridou SN, Naka KK, Chatzikyriakidou A, Calis KA, Makrigiannakis A, et al. Endothelial function, but not carotid intima-media thickness, is affected early in menopause and is associated with severity of hot flushes. *J Clin Endocrinol Metab*. Mar;95(3):1199-206.
81. Lin JW, Caffrey JL, Chang MH, Lin YS. Sex, menopause, metabolic syndrome, and all-cause and cause-specific mortality--cohort analysis from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Sep;95(9):4258-67.
82. Ambrose J, Hounsfield G. Computerized transverse axial tomography. *Br J Radiol*. 1973 Feb;46(542):148-9.
83. Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *Br J Radiol*. 1973 Dec;46(552):1016-22.
84. Lange S, Grumme T, Meese W, Wullenweber R, zum Winkel K. [Axial computer tomography of the brain]. *Rontgenblatter*. 1976 May;29(5):211-21.
85. Khan R, Rawal S, Eisenberg MJ. Transitioning from 16-slice to 64-slice multidetector computed tomography for the assessment of coronary artery disease: are we really making progress? *Can J Cardiol*. 2009 Sep;25(9):533-42.
86. Bellin MF, Stacul F, Webb JA, Thomsen HS, Morcos SK, Almen T, et al. Late adverse reactions to intravascular iodine based contrast media: an update. *Eur Radiol*. 2011 Nov;21(11):2305-10.

87. Cruz DN, Goh CY, Marenzi G, Corradi V, Ronco C, Perazella MA. Renal replacement therapies for prevention of radiocontrast-induced nephropathy: a systematic review. *Am J Med.* 2012 Jan;125(1):66-78 e3.
88. Maliborski A, Zukowski P, Nowicki G, Boguslawska R. Contrast-induced nephropathy--a review of current literature and guidelines. *Med Sci Monit.* 2011 Sep;17(9):RA199-204.
89. Pannu HK, Flohr TG, Corl FM, Fishman EK. Current concepts in multi-detector row CT evaluation of the coronary arteries: principles, techniques, and anatomy. *Radiographics.* 2003 Oct;23 Spec No:S111-25.
90. Williams MC, Reid JH, McKillop G, Weir NW, van Beek EJ, Uren NG, et al. Cardiac and coronary CT comprehensive imaging approach in the assessment of coronary heart disease. *Heart.* 2011 Aug;97(15):1198-205.
91. Schroeder S, Achenbach S, Bengel F, Burgstahler C, Cademartiri F, de Feyter P, et al. Cardiac computed tomography: indications, applications, limitations, and training requirements: report of a Writing Group deployed by the Working Group Nuclear Cardiology and Cardiac CT of the European Society of Cardiology and the European Council of Nuclear Cardiology. *Eur Heart J.* 2008 Feb;29(4):531-56.
92. Leber AW, Knez A, Becker A, Becker C, von Ziegler F, Nikolaou K, et al. Accuracy of multidetector spiral computed tomography in identifying and differentiating the composition of coronary atherosclerotic plaques: a comparative study with intracoronary ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Apr 7;43(7):1241-7.
93. Leber AW, Becker A, Knez A, von Ziegler F, Sirol M, Nikolaou K, et al. Accuracy of 64-slice computed tomography to classify and quantify plaque volumes in the proximal coronary system: a comparative study using intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Feb 7;47(3):672-7.

94. George RT. Computed tomography myocardial perfusion imaging: developmental points of emphasis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2009 Feb;7(2):99-101.
95. Sarwar A, Rieber J, Mooyaart EA, Seneviratne SK, Houser SL, Bamberg F, et al. Calcified plaque: measurement of area at thin-section flat-panel CT and 64-section multidetector CT and comparison with histopathologic findings. *Radiology.* 2008 Oct;249(1):301-6.
96. Folsom AR, Kronmal RA, Detrano RC, O'Leary DH, Bild DE, Bluemke DA, et al. Coronary artery calcification compared with carotid intima-media thickness in the prediction of cardiovascular disease incidence: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Arch Intern Med.* 2008 Jun 23;168(12):1333-9.
97. Bamberg F, Dannemann N, Shapiro MD, Seneviratne SK, Ferencik M, Butler J, et al. Association between cardiovascular risk profiles and the presence and extent of different types of coronary atherosclerotic plaque as detected by multidetector computed tomography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):568-74.
98. Hausleiter J, Meyer T, Hadamitzky M, Kastrati A, Martinoff S, Schomig A. Prevalence of noncalcified coronary plaques by 64-slice computed tomography in patients with an intermediate risk for significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jul 18;48(2):312-8.
99. Funabashi N, Asano M, Komuro I. Predictors of non-calcified plaques in the coronary arteries of 242 subjects using multislice computed tomography and logistic regression models. *Int J Cardiol.* 2007 Apr 25;117(2):191-7.
100. Ramadan MM, Mahfouz EM, Gomaa GF, El-Diasty TA, Alldawi L, Ikrar T, et al. Evaluation of coronary calcium score by multidetector computed

tomography in relation to endothelial function and inflammatory markers in asymptomatic individuals. *Circ J*. 2008 May;72(5):778-85.

101. Meijboom WB, van Mieghem CA, Mollet NR, Pugliese F, Weustink AC, van Pelt N, et al. 64-slice computed tomography coronary angiography in patients with high, intermediate, or low pretest probability of significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 9;50(15):1469-75.

102. Polonsky TS, McClelland RL, Jorgensen NW, Bild DE, Burke GL, Guerci AD, et al. Coronary artery calcium score and risk classification for coronary heart disease prediction. *JAMA*. 2010 Apr 28;303(16):1610-6.

103. Bonow RO. Clinical practice. Should coronary calcium screening be used in cardiovascular prevention strategies? *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):990-7.

104. Ioannidis JP, Tzoulaki I. What makes a good predictor?: the evidence applied to coronary artery calcium score. *JAMA*. 2010 Apr 28;303(16):1646-7.

105. Sun Z, Choo GH, Ng KH. Coronary CT angiography: current status and continuing challenges. *Br J Radiol*. 2012 May;85(1013):495-510.

106. Rivera JJ, Nasir K, Cox PR, Choi EK, Yoon Y, Cho I, et al. Association of traditional cardiovascular risk factors with coronary plaque sub-types assessed by 64-slice computed tomography angiography in a large cohort of asymptomatic subjects. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):451-7.

107. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*. 2003 Oct 14;108(15):1772-8.

108. Eroglu E, Bayrak F, Gemici G, Guneyusu T, Mutlu B, Kalkan AK, et al. Prevalence of coronary artery disease in low to moderate-risk asymptomatic

women: a multislice computed tomography study. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2008 Oct;36(7):439-45.

109. van Werkhoven JM, Bax JJ, Nucifora G, Jukema JW, Kroft LJ, de Roos A, et al. The value of multi-slice-computed tomography coronary angiography for risk stratification. *J Nucl Cardiol.* 2009 Nov-Dec;16(6):970-80.

110. Hsu CH, Chang SG, Hwang KC, Kuo CF, Chang HH, Chou PH. The impact of the menopause on coronary artery calcification examined by multislice computed tomography scanning. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008 May;18(4):306-13.

111. Michos ED, Nasir K, Braunstein JB, Rumberger JA, Budoff MJ, Post WS, et al. Framingham risk equation underestimates subclinical atherosclerosis risk in asymptomatic women. *Atherosclerosis.* 2006 Jan;184(1):201-6.

112. Raggi P, Gongora MC, Gopal A, Callister TQ, Budoff M, Shaw LJ. Coronary artery calcium to predict all-cause mortality in elderly men and women. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jul 1;52(1):17-23.

113. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, et al. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2006 Jul 13;355(2):125-37.

114. Mosca L, Barrett-Connor E, Wenger NK, Collins P, Grady D, Kornitzer M, et al. Design and methods of the Raloxifene Use for The Heart (RUTH) study. *Am J Cardiol.* 2001 Aug 15;88(4):392-5.

115. Onut R, Balanescu AP, Constantinescu D, Calmac L, Marinescu M, Dorobantu PM. Imaging Atherosclerosis by Carotid Intima-media Thickness in vivo: How to, Where and in Whom ? *Maedica (Buchar).* Jun;7(2):153-62.

116. Dewey M, editor. Coronary CT Angiography. Berlin, Germany: Springer; 2008.
117. Kwak BR, Back M, Bochaton-Piallat ML, Caligiuri G, Daemen MJ, Davies PF, et al. Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *Eur Heart J*. Nov 14;35(43):3013-20, 20a-20d.
118. LaCroix AZ, Chlebowski RT, Manson JE, Aragaki AK, Johnson KC, Martin L, et al. Health outcomes after stopping conjugated equine estrogens among postmenopausal women with prior hysterectomy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011 Apr 6;305(13):1305-14.
119. Smith NL, Blondon M, Wiggins KL, Harrington LB, van Hylckama Vlieg A, Floyd JS, et al. Lower risk of cardiovascular events in postmenopausal women taking oral estradiol compared with oral conjugated equine estrogens. *JAMA Intern Med*. 2014 Jan;174(1):25-31.
120. Tuomikoski P, Lyytinen H, Korhonen P, Hoti F, Vattulainen P, Gissler M, et al. Coronary heart disease mortality and hormone therapy before and after the Women's Health Initiative. *Obstet Gynecol*. 2014 Nov;124(5):947-53.
121. Scarabin-Carre V, Brailly-Tabard S, Ancelin ML, Maubaret C, Guiochon-Mantel A, Canonico M, et al. Plasma estrogen levels, estrogen receptor gene variation, and ischemic arterial disease in postmenopausal women: the three-city prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Aug;99(8):E1539-46.
122. Crandall CJ, Barrett-Connor E. Endogenous sex steroid levels and cardiovascular disease in relation to the menopause: a systematic review. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013 Jun;42(2):227-53.
123. Harman SM, Black DM, Naftolin F, Brinton EA, Budoff MJ, Cedars MI, et al. Arterial imaging outcomes and cardiovascular risk factors in recently

menopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2014 Aug 19;161(4):249-60.

124. Boukhris M, Tomasello SD, Marza F, Bregante S, Pluchinotta FR, Galassi AR. Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women with Type II Diabetes Mellitus and the Impact of Estrogen Replacement Therapy: A Narrative Review. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:413920.

125. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2008 Jan 29;117(4):e25-146.

126. Kannel WB, Wilson PW. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med.* 1995 Jan 9;155(1):57-61.

127. Ahmad S, Xue Z, Silverman A, Lindsay J. Complexity of the relation between hemoglobin A1C, diabetes mellitus, and progression of coronary narrowing in postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 2013 Mar 15;111(6):793-9.

128. Beale CM, Collins P. The menopause and the cardiovascular system. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1996 Sep;10(3):483-513.

129. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Lehert P, Burger HG. The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women's Midlife Health Project. *Climacteric.* 2004 Dec;7(4):375-89.

130. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Ebeling PR, Randolph JF, Burger HG, et al. Central abdominal fat and endogenous hormones during the menopausal transition. *Fertil Steril.* 2003 Jun;79(6):1335-40.

131. Hallal PC, Andersen LB, Bull FC, Guthold R, Haskell W, Ekelund U. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet*. 2012 Jul 21;380(9838):247-57.
132. Yoo HJ, Choi KM. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes*. 2014 Jun 15;5(3):357-63.
133. Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and atherosclerosis: mechanistic insights. *Can J Cardiol*. 2015 Feb;31(2):177-83.
134. Lim S, Choi SH, Choi EK, Chang SA, Ku YH, Chun EJ, et al. Comprehensive evaluation of coronary arteries by multidetector-row cardiac computed tomography according to the glucose level of asymptomatic individuals. *Atherosclerosis*. 2009 Jul;205(1):156-62.
135. Seifarth H, Schlett CL, Lehman SJ, Bamberg F, Donnelly P, Januzzi JL, et al. Correlation of concentrations of high-sensitivity troponin T and high-sensitivity C-reactive protein with plaque progression as measured by CT coronary angiography. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2014 Nov-Dec;8(6):452-8.
136. Bacha F, Edmundowicz D, Sutton-Tyrell K, Lee S, Tfayli H, Arslanian SA. Coronary artery calcification in obese youth: what are the phenotypic and metabolic determinants? *Diabetes Care*. 2014 Sep;37(9):2632-9.
137. Kelley-Hedgpeth A, Lloyd-Jones DM, Colvin A, Matthews KA, Johnston J, Sowers MR, et al. Ethnic differences in C-reactive protein concentrations. *Clin Chem*. 2008 Jun;54(6):1027-37.
138. Stone PA, Kazil J. The relationships between serum C-reactive protein level and risk and progression of coronary and carotid atherosclerosis. *Semin Vasc Surg*. 2014 Dec;27(3-4):138-42.

139. Malik R, Aneni EC, Roberson L, Ogunmoroti O, Ali SS, Shaharyar S, et al. Measuring coronary artery calcification: is serum vitamin D relevant? *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):734-8.
140. Uemura H, Katsuura-Kamano S, Yamaguchi M, Nakamoto M, Hiyoshi M, Arisawa K. Association between dietary calcium intake and arterial stiffness according to dietary vitamin D intake in men. *Br J Nutr*. 2014 Oct 28;112(8):1333-40.
141. Menezes AR, Lamb MC, Lavie CJ, DiNicolantonio JJ. Vitamin D and atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol*. 2014 Nov;29(6):571-7.
142. Robinson AB, Tangpricha V, Yow E, Gurion R, Schanberg LE, McComsey GA. Vitamin D status is a determinant of atorvastatin effect on carotid intima medial thickening progression rate in children with lupus: an Atherosclerosis Prevention in Pediatric Lupus Erythematosus (APPLE) substudy. *Lupus Sci Med*. 2014;1(1):e000037.
143. Gurses KM, Tokgozoglu L, Yalcin MU, Kocyigit D, Dural M, Canpinar H, et al. Markers of subclinical atherosclerosis in premenopausal women with vitamin D deficiency and effect of vitamin D replacement. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):784-9.

9. ANEXOS

9.1 Acrónimos y Abreviaturas

NOMENCLATURA	SIGLAS
Arteria coronaria derecha	ACD
Arteria coronaria izquierda	ACI
Accidente Cerebro-Vascular	ACV
Ácido desoxirribonucleico	ADN
American Heart Association	AHA
Accidente Isquémico Transitorio	AIT
Atherosclerosis Risk in Communities	ARIC
American Society of Echocardiography	ASE
Coronary Artery Calcium Score/Score de Calcio Coronario	CACS/SCC
Cardio-Tomografía Computerizada	CTC
Dickkopf Homolog-1	DKK-1
Electrocardiograma	ECG
Enfermedad Coronaria	EC
Enfermedad Cardiovascular	ECV
Endotelina 1	ET-1
Estradiol	E2
Hormona folículo estimulante	FSH
Grosor Íntima Media	GIM
Lípidos de alta densidad	HDL
Hipertensión Arterial	HTA
Índice masa corporal	IMC
Kiloherzios	kHz
Lípidos de baja densidad	LDL
Lípidos de baja densidad oxidados	LDLox
Latidos por minuto	lpm
Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis	MESA
Megahertzios	MHz
Osteoprotegerina	OPG

Proteína C reactiva	PCR
Raloxifene Use for the Heart	RUTH
Polimorfismos de nucleotide simple	SNP
Tiroxina	T4
Tomografía Computerizada	TC
Hormona tiroideoestimulante	TSH
Trombosis Venosa	TV
Lípidos de muy baja densidad	VLDL
Women's Health Initiative	WHI

