



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Programa de doctorado 3042

**CUANTIFICACIÓN DEL CALCIO MINERAL EN LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA
MEDIANTE ANGIOGRAFÍA POR TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA: PERFIL
EVOLUTIVO Y RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DEL GRADO DE ESTENOSIS
VOLUMÉTRICA**

TESIS DOCTORAL

Doctorando:

D. Manuel Ángel Arrebola López

Directores:

Dr. D. Manuel Miralles Hernández

Dr. D. Juan Martínez León

Valencia, mayo de 2017

Don Manuel Miralles Hernández, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe* (Valencia).

Don Juan Martínez León, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Cirugía Cardiovascular por la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario (Valencia).

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado ***“Cuantificación del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante angiografía por tomografía computarizada: perfil evolutivo y relación con la progresión del grado de estenosis volumétrica”***, ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Licenciado en Medicina y Cirugía Don Manuel Ángel Arrebola López, y que se considera apto para su lectura y defensa pública ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, se extiende la presente certificación en Valencia a 15 de mayo de 2017.

Dr. D. Manuel Miralles Hernández



Prof. D. Juan Martínez León



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Miralles, *alma máter* de este proyecto. Gracias por inculcarme rigor en el trabajo y permitirme, a lo largo de estos últimos 10 años, aprender tantas cosas.

Al Prof. Juan Martínez, por su bondad y sus consejos. Gracias por haberme concedido el honor de co-dirigir esta Tesis Doctoral.

A los Pacientes que generosamente participaron en este estudio, porque sin su colaboración, esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible.

A la Dra. Sara Brugger y al Dr. Fernando Aparici, del Servicio de Radiodiagnóstico, por el apoyo técnico.

A todos mis compañeros de Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe*, por su ayuda y su amistad. Laura y Emma, muchas gracias.

En el apartado personal, mi gratitud y todo mi amor a María, mi esposa, por su apoyo incondicional y comprensión. Gracias también a Lluc, Celia y Manel, mis hijos, por su paciencia. Sois lo más valioso que tengo.

Por último, quiero agradecer infinitamente a mis padres, Ana y Manuel, todo su trabajo y sacrificio para que yo haya podido llegar hasta esta página. Sin su esfuerzo, todo esto, jamás hubiera existido.

ABREVIATURAS

EC: estenosis carotídea

AE: arteriosclerosis, ateromatosis

RM: resonancia magnética

ARM: angiografía por resonancia magnética

AngioTC: angiografía por tomografía computarizada

TC: tomografía computarizada

AVC: accidente vascular cerebral

Ca: calcio

OP: osteoporosis

OC: osteoclasto

OB: osteoblasto

OS: osteocito

DPH: densidad promedio mineral del hueso

CV: calcificación vascular

MGP*: matrix Gla protein

CML: célula muscular lisa

PTH: paratohormona

P: fósforo

OPN: osteopontina

OPG: osteoprotegerina

mRNA*: ácido ribonucleico mensajero



CVC: células calcificantes vasculares

FRCV: factores de riesgo cardiovascular

MEB: microscopio electrónico de barrido

FA: fosfatasa alcalina

Hb: Hemoglobina

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

LP(a): lipoproteína a

LDL*: lipoproteína de baja densidad

HDL*: lipoproteína de alta densidad

IDL*: lipoproteína de densidad intermedia

THS: terapia hormonal sustitutiva

BMP*: proteína morfogénica ósea

OLCs*: células de comportamiento osteoclástico

BPG*: osteocalcina

MMP: metaloproteinasa

IRC: insuficiencia renal crónica

AHSG*: 22 Heremans Schmid glycoprotein

ON: óxido nítrico

ONs: óxido nítrico sintetasa

CASR*: receptor sensor de calcio

ACI: arteria carótida interna

HU*: unidades Hounsfield

AS*: índice de Agatston

ASm: índice de Agatston modificado

LHV: laboratorio de hemodinámica vascular

Vbif: volumen de contraste en bifurcación carotídea

VCP: volumen de contraste de carótida primitiva

HTA: hipertensión arterial

PAS: presión arterial sistólica

PAD: presión arterial diastólica

ITB: índice tobillo/brazo

IMC: índice de masa corporal

AAS: ácido acetil-salicílico

MIP*: proyección de intensidad máxima

ECl: estenosis carótida interna

SNP*: polimorfismo de un solo nucleótido

FDG: fluorodesoxiglucosa

¹⁸F-FNa: ¹⁸F-fluoruro de sodio

EcoC: ecografía contrastada

PET*: tomografía por emisión de positrones

IMT*: espesor íntima-media

SFRP*: secreted frizzled related protein

RR: riesgo relativo

*: las abreviaturas con asterisco conservan las siglas de la terminología anglosajona



RESUMEN

Antecedentes: La cuantificación y caracterización del calcio (Ca) mineral (hidroxiapatita) en la bifurcación carotídea con AngioTC, y su relación con la sintomatología neurológica, en un estudio preliminar de casos y controles (*Miralles y cols. Eur J Vasc Endovasc Surg 2006*), constituye la base conceptual del presente estudio. Sus resultados, al igual que los de otras publicaciones, sugerían un posible papel protector del calcio en el desarrollo de eventos neurológicos. Sin embargo, su relación con la progresión de la aterosclerosis carotídea ha sido escasamente analizado.

Objetivos: *Principales:* 1. Diseñar un método de medición volumétrica de la aterosclerosis (AE) carotídea y contenido de Ca mediante AngioTC. 2. Analizar el grado de calcificación arterial y su relación con la progresión de la aterosclerosis carotídea. *Secundarios:* 3. Evaluar la relación entre calcificación arterial carotídea y descalcificación ósea, así como su posible conexión a través de los factores humorales implicados en la regulación del metabolismo Ca-P. 4. Estudiar un posible mecanismo genético común: relación entre los polimorfismos del gen de la OPG y la progresión de la calcificación en la placa de ateroma.

Pacientes y método: *Diseño:* Cohortes, medidas repetidas. *Pacientes:* 54 pacientes, neurológicamente asintomáticos con estenosis de la arteria carótida interna (ECI) >50% (eco-Doppler). *Determinaciones:* Medición del grado de ECI mediante eco-Doppler y proyecciones MIP 2D de AngioTC. Medición del Volumen del molde de contraste y contenido de Ca (AngioTC cuantitativa: *Agatston score* modificado: volumen de Ca (mm³) x densidad radiológica (unidades Hounsfield, UH) en reconstrucción volumétrica (*volume rendering*) de la bifurcación carotídea (volumen de



contraste entre 2 cm por debajo y 1 cm por encima de la bifurcación [VBif] y su cociente con un segmento de 1 cm en carótida primitiva [VCP]) (n=45). En todos los pacientes se repitió la exploración a los 12 ± 2 meses para valorar la variación en el contenido de Ca y en el grado de estenosis volumétrica de la bifurcación, como medición indirecta de la progresión/regresión de la AE carotídea. Densitometría ósea de columna y fémur (n=32), (basal y a los 12 ± 2 meses). Bioquímica y metabolismo Ca-P (Ca, P, vit D, PTH). Determinación de osteopontina (OPN) y osteoprotegerina (OPG) sérica y distribución de 7 SNPs del gen de la OPG seleccionados sobre bases bibliométricas (n=48).

Análisis estadístico: descriptivo (media [DE]); concordancia intra e interobservador (gráficos de Bland-Altman) y coeficiente de correlación intraclass (CCI), precisión eco-Doppler/AngioTC y Volumetría 3D/MIP 2D: sensibilidad (Sens), especificidad (Esp), índice kappa, curvas operador receptor (COR), comparación de medias (prueba T), análisis de regresión uni y multivariable.

Resultados: 1. La medición volumétrica de la bifurcación carotídea mostró una concordancia intra e interobservador con un CCI de 0,96 (IC 95%: 0,904-0,985) y 0,94 (IC 95%: 0,822-0,977), respectivamente. El VBif/VCP del grupo de $ECl < 50\%$ fue de $5,2\pm 1,8$ frente a $3,8\pm 1,3$ en el de $ECl > 50\%$ ($p=0,001$). El punto de corte óptimo de la relación VBif/VCP se identificó a partir de la curva COR en 4,1 (Sens=0,75; Esp=0,75, kappa=0,46). 2. La medición mediante AngioTC demostró, a los 12 meses, un aumento del volumen promedio de pared arterial (disminución del volumen de la columna de contraste), respecto al valor basal ($475,45 [155,6] \text{ mm}^3 \times \text{UH}$ vs $501,3 [171,9] \text{ mm}^3 \times \text{UH}$, $p=0,04$), así como un aumento del Ca intraplaca ($56,8 [52,3]$ vs $64,58 [57,8] \text{ mm}^3 \times \text{UH}$, $p=0,002$). El análisis univariable demostró una correlación inversa entre el contenido

basal de Ca y progresión de estenosis volumétrica de la bifurcación ($r=-0,481$; $p<0,001$). El análisis de regresión múltiple permitió ajustar un modelo de regresión lineal entre la reducción del volumen de la bifurcación (progresión de AE carotídea) y el contenido basal de Ca intraplaca, ajustado por el índice de masa corporal (IMC). 3. Se observó una disminución estadísticamente significativa de la densidad ósea respecto a la determinación basal (2,08 [0,22] vs 2,06 [0,23] g/cm²; $p=0,013$), así como un aumento del Ca intraplaca respecto a los valores basales (79,2 [55] vs 64,58 [49,2] mm³xUH, $p=0,12$). Sin embargo, se identificó una correlación positiva entre la variación relativa del contenido de Ca y la variación relativa de la densidad ósea ($r=0,574$, $p=0,003$). En otras palabras, una mayor tendencia a la osteoporosis se asoció con una menor tendencia a la progresión del calcio intraplaca. Así mismo, se observó una relación entre los niveles plasmáticos de Vit D y la densitometría basal ($r=-0,459$, $p=0,036$) y entre los niveles plasmáticos de HDL-colesterol y la variación relativa, respecto a los valores basales, de la densidad ósea ($r=-0,579$, $p=0,009$). El análisis univariable demostró una correlación inversa entre el incremento del contenido de calcio intraplaca y los niveles plasmáticos de vit D ($r=0,4$; $p=0,025$) y *score* Z en fémur ($r=0,378$; $p=0,047$). Sólo la concentración de P en orina presentó una correlación positiva moderada con el aumento de Ca intraplaca ($r=0,488$, $p=0,015$). Ninguna otra variable, entre los parámetros del metabolismo Ca-P, mostró relación con la calcificación arterial. 4. No se observaron diferencias entre la distribución de los SNPs en los pacientes de la muestra del estudio y el grupo control. Tampoco se observó relación entre el genotipo (SNPs) y la concentración de OPG sérica.

Conclusiones: 1. La medición volumétrica de la bifurcación carotídea supone un nuevo concepto basado en la valoración de la carga de placa más que en su efecto



hemodinámico o estenosis máxima. Dada su precisión en la detección de variaciones pequeñas de la luz arterial, este método puede ser de especial utilidad en estudios de progresión de placa. 2. Los resultados de este estudio sugieren que un mayor contenido de Ca confiere mayor estabilidad frente a la progresión de la AE carotídea y, eventualmente, a su capacidad para generar sintomatología tromboembólica. 3. Encontramos una tendencia independiente a la progresiva calcificación arterial y descalcificación ósea. Sin embargo, los resultados sugieren una relación temporal directa en la evolución del depósito de calcio en ambas localizaciones, por lo que no es posible descartar que su modulación se rija por mecanismos similares. 4. No se observó una relación estadísticamente significativa entre la distribución de los SNPs analizados y los niveles de la OPG o la calcificación intraplaca en los pacientes estudiados.

PALABRAS CLAVE: Arteriosclerosis, calcificación vascular, estenosis carotídea, AngioTC, densitometría ósea, osteoprotegerina, polimorfismos.

Quantification of mineral calcium in carotid atheromatosis with AngioCT: temporal profile and relation with the progression degree of volumetric stenosis

Summary

Background: Quantification and characterization of mineral calcium (Ca) (hydroxyapatite) in the carotid bifurcation with AngioCT, and its relation with neurological symptomatology, in a preliminary case-control study (*Miralles et al., Eur J Vasc Endovasc Surg 2006*) Constitutes the conceptual basis of the present study. Their results, like those of other publications, suggested a possible protective role for calcium in the development of neurological events. However, its relationship with the progression of carotid atheromatosis has been scarcely analyzed.

Objectives: Primary: 1. To design a method of volumetric measurement of carotid atheromatosis (AE) and Ca content by AngioCT. 2. To analyze the degree of arterial calcification and its relation with the progression of carotid atheromatosis. Secondary: 3. To evaluate the relationship between carotid artery calcification and bone decalcification, as well as its possible connection through humoral factors involved in the regulation of Ca-P metabolism. 4 To study a possible common genetic mechanism: relationship between polymorphisms of osteoprotegerin (OPG) gene and the progression of calcification in the atherosclerotic plaque.

Patients and method: *Design:* Cohorts, repeated measures. *Patients:* 54 asymptomatic patients with internal carotid artery stenosis CAS>50% (duplex scanning). *Determinations:* Measurement of CAS grade with duplex scanning and MIP 2D projections of AngioCT. Volume measurement of contrast medium and Ca content



(quantitative AngioCT: Agatston score: Ca volume (mm^3) x radiological density (Hounsfield units, HU) in volume reconstruction of the carotid bifurcation [contrast volume between 2 cm below and 1 cm above the bifurcation (BifV) and its ratio with that from 1 cm segment in common carotid artery (CCV)] (n=45). In all patients, the scans was repeated at 12 ± 2 months to assess the variation in Ca content and the degree of bifurcation volumetric stenosis as an indirect measure of carotid AE progression / regression. Bone and spine densitometry (n=32), where obtained at baseline and after 12 ± 2 months, as well as Biochemistry and Ca-P metabolism parameters (Ca, P, vit D, PTH). Determination of plasma levels of osteopontin (OPN) and osteoprotegerin (OPG) where compared with the distribution of 7 SNPs of the OPG gene selected on bibliometrics bases (n=48).

Statistical analysis: descriptive [mean (SD)]; Intra and interobserver agreement (Bland-Altman plots and intraclass correlation coefficient (ICC), duplex scanning / AngioCT precision and 3D Volumetry / MIP 2D: Sensitivity (S), specificity (E), kappa index, ROC curves, means comparison (T test), univariate and multivariate regression analysis.

Results: 1. The volumetric measurement of the carotid bifurcation showed intra and interobserver agreement with a ICC of 0.96 (95% CI: 0.904-0.985) and 0.94 (95% CI: 0.822-0.977), respectively. The BifV/CCV of the CAS > 50% group was 5.2 ± 1.8 vs 3.8 ± 1.3 in the CAS >50% group (p=0.001). The optimum cutoff point for the BifV/CCV relation was identified from the ROC curve at 4,1 (S=0.75, E=0.75, kappa=0.46). 2. AngioCT measurement showed, at 12 months, an increase in mean arterial wall volume (decrease in contrast column volume), compared to baseline ($475.45 [155.6] \text{mm}^3 \times \text{HU}$ vs $501.3 [171.9] \text{mm}^3 \times \text{HU}$, p=0.04), as well as an increase in intraplaque Ca

(56.8 [52.3] vs 64.58 [57.8] mm³xHU, p=0.002). Univariate analysis showed an inverse correlation between basal Ca content and progression of bifurcation volumetric stenosis (r=-0.481; p<0.001). The multiple regression analysis allowed to fit a linear regression model between the reduction of bifurcation volume (carotid AE progression) and the baseline intraplaque content of Ca, adjusted for body mass index (BMI). 3. A statistically significant decrease in bone density was observed with respect to the baseline determination (2.08 [0.22] vs 2.06 [0.23] g/cm², p=0.013), as well as increased intraplaque Ca as compared with baseline values (79.2 [55] vs 64.58 [49.2] mm³xHU, p=0.12). However, a positive correlation was identified between the relative variation of Ca content and the relative variation of bone density (r=0.574, p=0.003). In other words, a greater tendency to osteoporosis was associated with a lower tendency to progression of intraplaque calcium. Likewise, a relationship between Vit D plasma levels and baseline densitometry (r=-0.459, p=0.036) and between plasma HDL-cholesterol levels and the relative variation, relative to baseline values, were observed. Bone density (r=-0.579, p=0.009). The univariate analysis showed an inverse correlation between the basal Ca content and the progression of bifurcation volumetric stenosis (r=-0.481; p<0.001), as well as between the increase in the intraplaque calcium content and plasma levels of vit D (R=0.4, p=0.025) and femur Z score (r=0.378, p=0.047). Only the urine P concentration presented a moderate positive correlation with the increase of intra-plaque Ca (r=0.488, p=0.015). No other variable, among Ca-P metabolism parameters, was related to arterial calcification. 4. There were no differences between the distribution of SNPs in patients and control group. There was also no relationship between genotype and serum OPG concentration.



Conclusions: 1. The volumetric measurement of the carotid bifurcation is a new concept based on the assessment of the plaque load rather than on its hemodynamic effect or maximal stenosis. Given its accuracy in detecting small variations in arterial lumen, this method may be especially useful in plaque progression studies. 2. The results of this study suggest that a higher content of Ca confers greater stability against the progression of carotid AE and, eventually, its capacity to generate symptomatology. 3. We found an independent tendency to progressive arterial calcification and bone decalcification. However, the results suggest a direct temporal relationship in the evolution of the calcium deposit in both locations, so it is not possible to rule out that its modulation is controlled by similar mechanisms. 4. The results are inconclusive with regard to the role of OPG in AE plaque calcification. No significant relationship between the distribution of SNPs analyzed and OPG levels in the studied patients was observed.

KEY WORDS: Arteriosclerosis, vascular calcification, carotid stenosis, AngioCT, bone densitometry, osteoprotegerin, polymorphisms.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	21
1.1 CALCIFICACIÓN ARTERIAL: PREVALENCIA E HISTORIA NATURAL	22
1.2 LOCALIZACIÓN: TIPOS DE CALCIFICACIÓN ARTERIAL	27
1.3 FACTORES PREDISPONETES	35
1.4 PATOGÉNESIS	45
1.5. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CALCIFICACIÓN ARTERIAL	71
1.5.1 MÉTODOS DE IMAGEN	71
1.5.2 DETERMINACIONES TISULARES	82
1.6 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL	89
1.6.1 CALCIFICACIÓN CORONARIA	89
1.6.2 CALCIFICACIÓN CAROTÍDEA Y PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL	92
1.6.3 CALCIFICACIÓN VASCULAR Y OSTEOPOROSIS	96
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	99
2.1 HIPÓTESIS	99
2.1.1 HIPÓTESIS CONCEPTUAL	99
2.1.2 HIPÓTESIS OPERATIVA.....	99
2.2 OBJETIVOS	100
2.2.1 OBJETIVOS PRINCIPALES.....	100
2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	100
3. MATERIAL Y MÉTODO	101
3.1 ESTUDIO PILOTO	101
Cuantificación y caracterización del calcio carotídeo con AngioTC en pacientes neurológicamente sintomáticos y asintomáticos.	101
3.2 ESTUDIO ACTUAL	102
Cuantificación del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante AngioTC: perfil evolutivo y relación con la progresión del grado de estenosis volumétrica	102
3.2.1 DISEÑO	102
3.2.2 PACIENTES	105
3.2.3 CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	106
3.2.4 VARIABLES Y DETERMINACIONES.....	107



3.2.5 CONTROL DE SESGOS	118
3.2.6 RECOGIDA DE DATOS	118
3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	120
3.2.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS. CONSENTIMIENTO INFORMADO	122
4. RESULTADOS	123
4.1 ESTUDIO PILOTO	124
4.2 ESTUDIO ACTUAL	128
4.2.1 MEDICIÓN VOLUMÉTRICA DE LA BIFURCACIÓN CAROTÍDEA. CONCEPTO ALTERNATIVO A LA GRADACIÓN DE LA ESTENOSIS	128
4.2.2 DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRAPLACA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA	133
4.2.3 CALCIFICACIÓN ARTERIAL Y DESCALCIFICACIÓN ÓSEA. RELACIÓN ENTRE AMBOS PROCESOS	140
4.2.4 ANÁLISIS GENÉTICO (POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA OPG) Y PROGRESIÓN DE LA CALCIFICACIÓN EN LA PLACA DE ATEROMA	147
5. DISCUSIÓN	151
5.1 ESTUDIO PILOTO	152
5.2 ESTUDIO ACTUAL	153
5.2.1 MEDICIÓN VOLUMÉTRICA DE LA BIFURCACIÓN CAROTÍDEA. CONCEPTO ALTERNATIVO A LA GRADACIÓN DE LA ESTENOSIS	153
5.2.2 DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRAPLACA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA	160
5.2.3 CALCIFICACIÓN ARTERIAL Y DESCALCIFICACIÓN ÓSEA. RELACIÓN ENTRE AMBOS PROCESOS	165
5.2.4 ANÁLISIS GENÉTICO (POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA OPG) Y PROGRESIÓN DE LA CALCIFICACIÓN EN LA PLACA DE ATEROMA	173
5.2.5 FORTALEZAS Y LIMITACIONES	175
6. CONCLUSIONES	179
7. BIBLIOGRAFÍA	181
8. ANEXOS	211

1.INTRODUCCIÓN

Los estudios epidemiológicos desarrollados durante las dos últimas décadas han permitido establecer la relación entre el grado de estenosis carotídea (EC), la aparición de eventos neurológicos agudos y su implicación en la toma de decisiones terapéuticas⁽¹⁾. El desarrollo técnico de las pruebas de imagen y su capacidad para discriminar los diferentes componentes de la placa de arteriosclerosis (AE) (tejido fibroso, lípidos y calcio) estaría cambiando este paradigma, ya que la EC no refleja en realidad el alcance total de la enfermedad arteriosclerosa como sugiere el hecho de que en la mayoría de los pacientes sintomáticos presentan tan solo estenosis moderadas⁽²⁾.

La relación entre la calcificación de la placa de AE y el riesgo posterior de desarrollar episodios isquémicos ha sido sugerida en diversos estudios^(3, 4). Sin embargo, sus resultados, a menudo contradictorios, se han visto limitados por la falta de un método adecuado de detección y cuantificación del calcio mineral *in vivo*. De hecho, la presencia de calcio (Ca) en la placa AE se considera un inconveniente, pues es fuente de artefactos en la mayor parte de métodos diagnósticos por imagen -ecografía, angiografía, resonancia magnética (RM)-.

Solo recientemente, la angiografía mediante tomografía computarizada (AngioTC) ha permitido la identificación y caracterización precisa del calcio en la placa de ateroma. La mayor parte de los estudios que analizan la precisión de esta técnica en la determinación del contenido de calcio en muestras de endarterectomía carotídea *in vitro*, comparan sus resultados con la masa residual tras la incineración de la muestra (correspondiente en un 95% al remanente de hidroxapatita)⁽⁵⁾ encontrando una buena



correlación entre ambas medidas. A partir de estos estudios, se han desarrollado distintos índices para la estimación del contenido de calcio en la placa de AE.

La utilidad de la caracterización de la placa de ateroma y su relación con el riesgo de desarrollar accidentes isquémicos coronarios ha sido analizada en numerosos estudios. Sin embargo, existe menos información sobre sus prestaciones diagnósticas y pronósticas en el territorio carotídeo.

El objetivo principal de este trabajo ha consistido en caracterizar el contenido y distribución del calcio en la ateromatosis carotídea, evaluando su relación con la progresión volumétrica de la placa de ateroma mediante AngioTC y la relación de estas variaciones con la descalcificación ósea.

1.1 CALCIFICACIÓN ARTERIAL: PREVALENCIA E HISTORIA NATURAL

La “osificación” y “endurecimiento” de las arterias es un fenómeno conocido desde el siglo XVI. Rudolf Ludwig Karl Virchow en 1863, padre de la patología celular, fue el primero en observar la osificación activa y la formación de hueso *de novo* en la placa de ateroma⁽⁶⁾. Aunque ligado tradicionalmente al proceso de aterogénesis, fue Mönckeberg quien sugirió que la calcificación podía aparecer en la capa media como una entidad distinta de la AE. Desde entonces su nombre ha quedado relacionado al término de esclerosis medial calcificada⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

La calcificación de la carótida interna extracraneal se ha visto en el 50-60% de las placas, pero su relación con eventos isquémicos cerebrovasculares es incierta⁽⁹⁾. Sohn y cols.⁽¹⁰⁾ encontraron calcificaciones arteriales, mediante TC, en el 40% de 57 pacientes consecutivos con AVC isquémico. En un metanálisis realizado por Rennenberg y

cols.⁽¹¹⁾, se determinó el riesgo de eventos adversos mayores en pacientes con calcificación vascular versus aquellos sin calcificación. Se examinaron los datos de 218.080 pacientes de 30 estudios. Aquellos que presentaban calcificación arterial tenían un riesgo de 2,21 (IC 1,81-2,69) para sufrir un evento cerebrovascular respecto a los que no presentaban calcificación arterial.

Las formas cálcicas predominantes en la calcificación vascular a partir del depósito de Calcio mineral (Ca^{2+}), son en el octocalcio fosfato $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_{6,5}\text{H}_2\text{O}]$ para posteriormente transformarse en hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, y apatita deficiente en calcio⁽¹²⁾. Con frecuencia estos compuestos aparecen asociados a las fibras elásticas, cuyos grupos carboxilo podrían actuar como puntos de nucleación. Estudios *in vitro* sugieren que el Ca puede unirse también a aminoácidos⁽¹³⁾. Aunque este mecanismo es el mejor conocido y, probablemente, el implicado inicialmente en la calcificación medial, se han descrito otros elementos potenciales de nucleación, entre ellos, destacan las vesículas observadas con frecuencia en la matriz extracelular, y que derivan del proceso apoptótico de células preexistentes.

A pesar de la incertidumbre sobre las circunstancias desencadenantes el descubrimiento de diversas proteínas moduladoras de la calcificación (osteocalcina, osteopontina [OPN], osteoprotegerina [OPG]) ha arrojado nueva luz sobre sus posibles mecanismos. Hunter y cols.⁽¹⁴⁾ estudiaron *in vitro* el papel de algunas de estas proteínas en la formación de cristales de hidroxiapatita, a partir de la precipitación en un sistema de gel de agarosa con diferentes concentraciones de calcio y fosfato y su posterior análisis con difracción de rayos X. La confirmación de hidroxiapatita en la banda de precipitación de la sialoproteína sugieren su papel preponderante en el desencadenamiento inicial del proceso. Por otra parte, el papel inhibitorio de la OPN



(fosfoproteína que se encuentra habitualmente en las regiones de calcificación distrófica) podría explicarse, más que por su quelación directa, por la interacción directa de la OPN con la superficie del cristal en formación, que previene el depósito de nuevos iones de calcio⁽¹⁵⁾.

Los estudios *post-mortem* sugieren que el fenómeno de la calcificación arterial comienza en la juventud y evoluciona con los años. Los depósitos de calcio aparecen inicialmente como gránulos microscópicos entre grandes cantidades de lípidos extracelulares. Con los años, estos gránulos se unen y crecen formando estructuras mayores, pudiendo formar incluso metaplasia ósea como último escalón evolutivo.

En relación a la evolución de la placa AE y su proceso de calcificación, la *American Heart Association* (AHA) ha propuesto la siguiente clasificación⁽¹⁶⁾:

- *Tipo I y II*: No tienen depósitos de calcio y están formadas principalmente por células espumosas que contienen vesículas lipídicas. Estas lesiones se encuentran ya en la pubertad y en adultos jóvenes.
- *Tipo III*: En ellas se añaden acúmulos de lípidos extracelulares.
- *Tipo IV*: Son las primeras que contienen calcio. Las células musculares lisas de la capa íntima se encuentran rodeadas por un *core* lipídico. Presumiblemente, este ambiente que las rodea, produce alteraciones en sus organelas y las hace incapaces de metabolizar el exceso de sales cálcicas, que precipitan formando gránulos de calcio. Cuando la célula muere y se rompe su membrana, éstos salen a la matriz extracelular en forma de vesículas calcificadas, cuya yuxtaposición acaba formando verdaderos depósitos de calcio.
- *Tipo V y VI*: Corresponden a los estadios más avanzados en los que se han ido agregando depósitos sucesivos que pueden dar lugar a calcificaciones de cientos

de micras e incluso milímetros. En éstas aparece también tejido fibroso que puede fisurarse y causar la rotura de la placa.

- *Tipo VII:* Comprenden aquellas en las que ya se ha producido metaplasia ósea.

En la Fig. 1.1 se representan ejemplos histológicos de diferentes grados de lesión arterial. Las imágenes representan cortes sagitales de arterias coronarias con tinción tricrómica de Masson⁽¹⁷⁾.

Como puede observarse en esta clasificación, las primeras calcificaciones se identifican en lesiones ya avanzadas (tipo IV y superiores). Aparecen habitualmente bajo la forma de gránulos de 5-10 μm el interior del citoplasma de células musculares lisas (CMLs). Su localización en el interior de diversas organelas, principalmente mitocondrias, sugieren una afectación del transporte activo del Ca en sus membranas por mecanismos similares a los de la hipoxia. No obstante, ésta no es su única situación, identificándose también en el espacio extracelular bajo la forma de vesículas rodeadas de calcio y matriz extracelular. Su origen, procedente de la lisis de CMLs con calcio intracitoplásmico, no parece ser suficiente para explicar estos depósitos, por lo que se han sugerido otras posibles fuentes. La hipótesis de la fagocitosis de los gránulos de calcio, por los macrófagos de la zona, no ha podido ser verificada. Por tanto, el depósito de calcio sobre acúmulos de detritus derivados de la apoptosis de otras células, especialmente CMLs, parece, por el momento, la explicación más probable⁽¹⁸⁾.

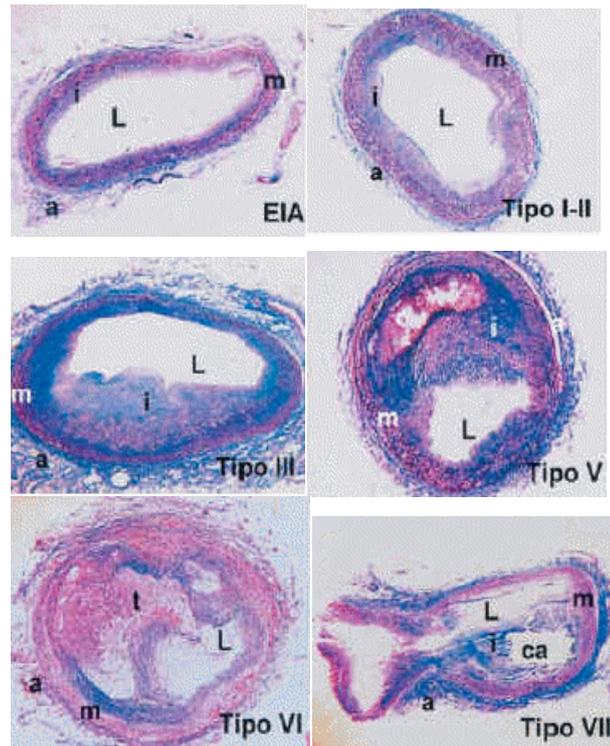


Figura 1.1 Arterias coronarias en diferentes grados de lesión (tinción tricrómica de Massons). EIA: engrosamiento intimal arterial; a: adventicia; c: core lipídico; ca: calcificación; i: íntima; L: lumen; m: media; t: trombo. Tomado de Juan Babot y cols. Rev Esp Cardiol. 2003⁽¹⁷⁾.

En condiciones normales, los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por macrófagos, pero, en un ambiente de exceso de lípidos, como es el núcleo de la placa AE, la fagocitosis entra en competencia con la de los lípidos oxidados, llegando a ser insuficiente. Por otra parte, las concentraciones elevadas de iones calcio y la alteración de las proteínas reguladoras/ligadoras de calcio pueden favorecer su precipitación bajo la forma de distintas sales. En efecto, los niveles tisulares locales de calcio y fosfato pueden verse aumentados como consecuencia de su liberación desde el citoplasma tras la muerte celular, así como por el mismo proceso inflamatorio de la placa. Además, se ha observado que las concentraciones elevadas de calcio aumentan la expresión de MGP (*matrix Gla protein*), mientras que la elevación de fosfato puede inducir la diferenciación osteogénica de las CMLs, como demuestra la expresión en su superficie de marcadores como la osteopontina o sialoproteína⁽¹⁹⁾.

Habitualmente, a partir de la quinta década de la vida, los gránulos así formados tienden a confluír en placas de varias μm e incluso mm , localizadas en la base de la lesión y, ocasionalmente, sobre el core lipídico. Su composición es similar a la de los gránulos: 71% apatita cálcica, 9% carbonato cálcico y 15% proteínas, llegando a constituir hasta el 20% del volumen de la lesión en los tipos IV y V⁽²⁰⁾. Cuando los depósitos de calcio confluyen, puede desarrollarse metaplasia ósea, es decir, formación de verdadero tejido óseo con osteoclastos, osteoblastos y médula ósea. La calcificación distrófica o metaplásica sucede, de hecho, en múltiples patologías inflamatorias, y parece depender de la respuesta angiogénica resultante de la inflamación. La muerte celular de los tejidos que sufren procesos inflamatorios también parece contribuir a la calcificación distrófica⁽²¹⁾.

1.2 LOCALIZACIÓN: TIPOS DE CALCIFICACIÓN ARTERIAL

Existen dos tipos de calcificación arterial clínica e histológicamente diferenciados. La calcificación de la capa media (enfermedad de Mönckeberg), que se asocia con diversas alteraciones metabólicas y electrolíticas y la calcificación de la capa íntima⁽²²⁾, relacionada con la AE.

Es frecuente la confusión entre ambos tipos, a pesar de ser diferente su localización, histología y patogénesis.

Durante muchos años, se pensó en la calcificación arterial como un proceso pasivo, resultado de unos niveles de fósforo sérico (P^{-2}) y fosfato cálcico elevados, con una saturación plasmática de estos productos⁽²³⁾. Sin embargo, estudios recientes, han revelado una relación entre la calcificación vascular y la osteogénesis. Muchos reguladores claves en la formación del hueso, así como proteínas estructurales del



hueso se expresan tanto en capas arteriales mediales calcificadas como en placas AE⁽²⁴⁾ lo cual sugiere que la calcificación vascular es un proceso activo en el que también participarían inhibidores fisiológicos de la misma.

1.2.1 CALCIFICACIÓN MEDIAL

La calcificación medial fue descrita como una calcificación en forma de lámina, en la capa de músculo liso de la pared arterial sin depósitos de lípidos o colesterol, y por tanto sin reducción de la luz arterial.

La calcificación de la capa media aumenta con la edad, en las alteraciones metabólicas producidas por la diabetes, en la enfermedad renal crónica y también puede ser inducida experimentalmente por diferentes tratamientos (vitamina D, vitamina D en ambiente deficitario de magnesio o warfarina)⁽²⁵⁾.

Microscópicamente se presenta como una calcificación concéntrica con mineralización de las fibras elásticas, aunque pueden llegar a aparecer auténticos depósitos de calcio. Este tipo de calcificación arterial es independiente del proceso de aterogénesis, por lo que la íntima no suele presentar lesiones ni aumento en su espesor normal. Su localización es diferente y raramente afecta a las arterias coronarias⁽²²⁾, al contrario de lo que ocurre con la aterogénesis.

La calcificación medial confiere a la arteria mayor rigidez, ya que los depósitos de calcio se sitúan en las fibras elásticas, produciendo su desestructuración y disminuyendo la capacidad de adaptación a los cambios de presión arterial⁽²⁶⁾.

Este tipo de calcificación, también denominada esclerosis de Mönckeberg, puede apreciarse fácilmente mediante radiografía simple en individuos con enfermedades metabólicas, presentándose con elevada frecuencia y severidad en enfermedades que

se caracterizan por desequilibrios metabólicos, electrolíticos y del pH, entre los que destacan la diabetes, la insuficiencia renal crónica y las alteraciones de la paratohormona (PTH):

1.2.1.1 Diabetes

Numerosos estudios documentan la mayor prevalencia y extensión de la calcificación arterial de la capa media en los pacientes diabéticos. La enfermedad de Mönckeberg resulta un indicador de severidad y duración de la diabetes, estando asociada a muchas de sus complicaciones, principalmente a la neuropatía del sistema vegetativo autónomo⁽²²⁾. Este fenómeno se ha constatado con anterioridad en pacientes no diabéticos sometidos a simpatectomía lumbar⁽²⁷⁾. Sin embargo, otros estudios sobre pacientes diabéticos sugieren que la cuantificación de la calcificación coronaria no es un buen marcador de severidad lesional, ya que la calcificación medial es independiente del proceso aterogénico⁽²⁸⁾.

Por otra parte, se ha sugerido que, en pacientes diabéticos, la calcificación medial podría estar asociada a un aumento de complicaciones cardiovasculares. Así Lehto y cols.⁽²⁹⁾, en una serie de 1059 pacientes, en los que se determinó la calcificación femoral mediante radiografía simple con un seguimiento de 7 años, encontraron que la calcificación medial era un factor de riesgo independiente de mortalidad cardiovascular tras ajustar por otros factores de riesgo (OR=1,6, IC 95%:1,1-2,2). En cambio, en el *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study* no se constató dicha relación⁽³⁰⁾.

Todos estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que, en la mayoría de los casos, el método utilizado para el diagnóstico de calcificación medial es la



radiografía simple, la cual es poco sensible y específica además de no ser objetiva, haciendo que la interpretación de los resultados sea poco valorable. Otra posible causa de la discordancia de conclusiones entre los diferentes estudios, como sugirieron Edmonds y cols., es que el efecto de la calcificación medial en los diabéticos sea secundario al aumento de rigidez arterial, disminución de capacidad de relajación del vaso y aumento de la presión sistólica⁽³¹⁾, cuyo efecto sinérgico puede contribuir al desarrollo de AE en estos pacientes. En este sentido, no queda tan claro que, en el caso de individuos no diabéticos, la calcificación medial aumente el riesgo cardiovascular. Así, por ejemplo, Everhart y cols., en su estudio longitudinal con 4553 pacientes no diabéticos con calcificación medial, no encontraron aumento de la tasa de mortalidad cardiovascular en relación a los controles, tras un seguimiento de 20 años⁽³²⁾.

1.2.1.2 Insuficiencia Renal Crónica (IRC)

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en pacientes con IRC avanzada. Portoles y cols.⁽³³⁾ realizaron un estudio multicéntrico poblacional en España que incluyó 1710 pacientes en hemodiálisis, el cual mostró que la patología cardiovascular era la más prevalente entre las causas de morbi-mortalidad (>16% tenían enfermedad coronaria y 5,5% arteriopatía periférica). Esto se debe, probablemente, a las anomalías metabólicas y electrolíticas asociadas al fallo renal. Hasta no hace mucho, la calcificación vascular en los pacientes afectados de IRC se consideraba un proceso pasivo, como resultado del aumento de productos Ca/P circulantes, atribuido al hiperparatiroidismo secundario que suele asociarse en estos pacientes. Actualmente, se considera que la calcificación arterial tiene su origen en los

diferentes insultos metabólicos que padecen estos enfermos: diabetes, dislipemia, estrés oxidativo, uremia e hiperfosfatemia, contribuyen a la formación de células tipo osteoblasto en la pared vascular. Esta mineralización celular, así como el reclutamiento de progenitores indiferenciados de linaje osteocondrocítico juega un papel fundamental en el proceso de calcificación. Importantes factores de transcripción como Msx2, osterix y RUNX2 son cruciales en la activación de la osteogénesis. Así, por un lado el incremento en la activación de fenómenos de formación osteocondrocítica arterial y por otro la reducción de los mecanismos de protección celular, crean las circunstancias adecuadas para la calcificación vascular que se ve en los pacientes con IRC⁽³⁴⁾.

Estudios *ex vivo* han demostrado la importancia del fósforo extracelular y sus mecanismos reguladores. Las células sometidas a un ambiente con elevadas concentraciones de fosfato, introducen este ion en su citoplasma, el cual, por vías aún desconocidas, aumentan la expresión de Runx2/Cbfa1, potente factor de transcripción y diferenciación osteogénica. La producción de proteínas de metabolismo óseo resultante, junto con el aumento de los niveles de Ca, tiene como consecuencia el depósito de cristales de apatita que conlleva, finalmente, la calcificación vascular⁽³⁵⁾.

London y cols.⁽³⁶⁾ evaluaron la calcificación carotídea mediante ecografía y la calcificación medial periférica mediante radiografía simple en 202 pacientes en hemodiálisis, encontrando que la calcificación carotídea era más frecuente en pacientes de edad avanzada con historia previa de enfermedad cardiovascular, mientras que la calcificación medial se relacionaba con la duración de la hemodiálisis y los niveles plasmáticos de calcio y fósforo. En este estudio la calcificación medial se



comportaba como marcador pronóstico independiente de mortalidad cardiovascular, siendo su principal efecto el aumento de la rigidez arterial.

1.2.1.3 Hiperparatiroidismo / hipervitaminosis D

La paratohormona (PTH) y la vitamina D (vit D) son los principales reguladores del metabolismo óseo y de las concentraciones de iones de calcio y fósforo en sangre. La vit D se metaboliza por 3 enzimas diferentes del complejo citocromo p450, una de ellas, la citocromo 24, convierte la 25-hidroxitamina D en 24,25-dihidroxitamina D. Dziedzic y cols.⁽³⁷⁾, en un estudio prospectivo sobre 637 pacientes, en los que se valoró la afectación coronaria mediante angiografía y los niveles plasmáticos de 25-hidroxitamina D (25(OH)D), observaron en los pacientes >70 años una relación inversa entre los niveles de 25(OH)D y la severidad de arteriosclerosis coronaria. Así mismo, niveles bajos de 25(OH)D se asociaron inversamente a las cifras de colesterol, lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos, sugiriendo todo ello, una posible relación entre el metabolismo del Ca y los procesos de aterogénesis. Doherty y cols.⁽³⁸⁾ estudiaron la masa de calcio mediante tomografía computarizada (TC) en 283 pacientes asintomáticos con factores de riesgo cardiovascular y su asociación con los niveles séricos de vitamina D₃. Los resultados obtenidos indicaron que los niveles de 1,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol) se relacionaban de manera independiente e inversa con la calcificación coronaria obtenida mediante TC, sugiriendo un posible papel protector de la 1,25-dihidroxitamina D₃ frente a la calcificación, al promover el desarrollo en la pared arterial de células de comportamiento osteoclástico (OLCs)⁽³⁹⁾.

No obstante, los mecanismos subyacentes a las observaciones anteriormente descritas permanecen inciertos, pues en algunos estudios se ha visto que el calcitriol

puede inducir la expresión de la osteopontina (OPN), que actuaría como un inhibidor local de la calcificación de las CMLs⁽⁴⁰⁾ y en otros incrementaría la calcificación de las CMLs a través de la variación de los niveles de RANKL/osteoprotegerina (OPG)⁽⁴¹⁾.

Sabemos que la PTH, así como su péptido relacionado (PTHrP), actúan como mediadores de la calcificación vascular y que esta mediación podría estar influenciada por el tipo de receptor involucrado (PTHR1 y PTHR2). A pesar de esto, no se ha realizado una comparación del efecto de la PTH sobre la AE (calcificación endocranal) frente a la calcificación medial, más típica en la diabetes⁽⁴²⁾.

1.2.2 CALCIFICACIÓN INTIMAL

Las arterias sanas presentan una íntima prácticamente inexistente, sin embargo, en zonas de mayor estrés hemodinámico, se produce un aumento de grosor por la proliferación fibromuscular que sucede como mecanismo adaptativo, siendo estas áreas las que desarrollarán placas de ateroma. La calcificación intimal acontece únicamente sobre las placas de arteriosclerosis. Los depósitos de calcio en la íntima se distribuyen según dos patrones diferenciados:

- *Patrón puntiforme*: se trata de pequeñas áreas calcificadas que describen un patrón punteado, se desarrollan en la parte basal de la íntima (adyacentes a la capa media) y, algunas veces, pueden organizarse para formar focos de calcificación e, incluso metaplasia ósea que contiene tejido hematopoyético medular, células de tipo osteoblasto, osteoclasto y condrocito y expresa proteínas típicas de metabolismo óseo⁽¹⁹⁾. En fases avanzadas de la placa AE (estadios V-VII) estos focos de calcificación pueden confluir en extensas placas que llegan a ocupar hasta el 50% de la misma.



- *Patrón difuso*: Con la introducción de nuevas técnicas histoquímicas que no requieren de descalcificación para el estudio de la placa arteriosclerosa, Fitzpatrick y cols.⁽²⁸⁾ describieron la existencia de un patrón de calcificación fina y difusa en la superficie de la placa, además de la punteada. Este patrón puede apreciarse, teóricamente, en todas las áreas de la íntima, pero no es identificable mediante métodos de imagen convencionales por la similitud de su densidad a la del tejido adyacente. Hasta ahora se desconoce la historia natural de este patrón difuso de calcificación, pero es razonable pensar que pudiera ser una fase precoz o previa de la calcificación punteada⁽³⁶⁾.

La calcificación intimal es un proceso activo y regulado por múltiples factores. Su origen se encuentra íntimamente ligado a los mecanismos de aterogénesis, incluyendo el depósito subendotelial de lípidos oxidados y la subsiguiente respuesta inflamatoria. Además, los estudios histológicos demuestran la co-localización de macrófagos y linfocitos-T con los depósitos de calcio⁽⁴³⁾. Estas células inflamatorias secretan citoquinas y factores de crecimiento y diferenciación que, por mecanismos aún no bien conocidos, estimulan la expresión de proteínas de matriz asociadas al metabolismo óseo (osteocalcina, osteonectina, OPN, sialoproteína, MGP, BMP-2). De hecho, se ha comprobado, mediante técnicas de inmunohistoquímica, un aumento de la expresión del mRNA de estas proteínas en las regiones calcificadas⁽²⁸⁾. Diversos estudios indican su papel en la nucleación y crecimiento de cristales de apatita (calcio mineral); la OPN, por ejemplo, se une a su superficie inhibiendo su crecimiento, mientras que la sialoproteína puede actuar como agente nucleador para su formación⁽⁴⁴⁾. Además, son responsables de que las CMLs adopten un fenotipo osteogénico, transformándose en las que se ha denominado células calcificantes vasculares (CVCs)⁽⁴⁵⁾, las cuales

expresan también proteína S-100 ligadora de Ca y están localizadas en áreas de calcificación.

Por otro lado, cualquier mecanismo que aumente la concentración de Ca y P, tales como la muerte celular o el propio fenómeno inflamatorio favorecerá su deposición. Estos iones encuentran en las vesículas apoptóticas y en los ésteres de colesterol un punto de nucleación donde crecer en forma de cristales de hidroxapatita⁽⁴⁶⁾.

De los estudios observacionales realizados al respecto podemos deducir que la calcificación intimal es un proceso en el que están implicados el reclutamiento celular, diferentes factores osteogénicos, los componentes de la matriz y la concentración de calcio y fósforo, llegando a producir la calcificación del tejido por mecanismos que, sin ser completamente comprendidos, presentan una clara similitud con los de osteogénesis y remodelación ósea. Las diferencias observadas entre la localización de los depósitos en la calcificación medial e intimal, sugieren, que deben existir mecanismos diferentes en el desarrollo de ambas, a pesar de que algunas de sus vías puedan ser compartidas.

1.3 FACTORES PREDISPONENTES

Aunque la AE es el principal determinante del depósito de calcio en la íntima arterial, diversos factores aumentan su susceptibilidad o potencian dicho proceso. Algunos como la edad, diabetes, dislipemias o estrógenos están directamente implicados en los mecanismos de aterogénesis. Otros, como el hiperparatiroidismo o la IRC, aunque más relacionados con la calcificación medial, pueden actuar de forma sinérgica favoreciendo la calcificación de la placa AE. A continuación, analizamos con más detalle el papel de estos factores.



1.3.1 EDAD

Es el principal factor de riesgo de la AE. Con la edad se acelera la formación de la placa, aumentando el número de lesiones, su tamaño y el índice íntima/media⁽⁴⁷⁾. Esto podría ser debido a una larga exposición a otros factores de riesgo establecidos. Sin embargo, la composición de la placa también varía con la edad, aumentando con el paso del tiempo el contenido lipídico e inflamatorio y disminuyendo el tejido fibroso y las CMLs⁽⁴⁸⁾. Estos cambios se asocian con mayor riesgo de ulceración y ruptura de la placa con la consiguiente trombosis. Sin embargo, no se han evidenciado, diferencias consistentes en cuanto a los depósitos de calcio a nivel carotídeo como sugiere el estudio de Ostrom y cols.⁽⁴⁹⁾ En su análisis histológico de las muestras de endarterectomía de 383 pacientes, comprobaron que el contenido de lípidos y macrófagos, así como la expresión de MMP-9, era mayor en el cuartil de mayor edad, y la expresión de MMP-2 disminuía. Sin embargo, el contenido de calcio no mostraba cambios significativos con la edad.

1.3.2 DIABETES

La diabetes está clínicamente asociada a calcificación vascular tanto medial como intimal. A nivel celular, los productos de la glicosilación producen disfunción del endotelio por toxicidad directa e inducen la mineralización de los pericitos. Nilsson-Berglund y cols.⁽⁵⁰⁾, observaron como la glucosa y la 2-desoxiglucosa regulaban la expresión de la osteoporina a nivel transcripcional. Además, los niveles de glicemia en los diabéticos tipo I han demostrado asociación con la progresión de la calcificación coronaria⁽³¹⁾.

La calcificación medial observada en pacientes diabéticos está íntimamente ligada a su relación con los procesos de aterogénesis en lo que se ha dado en llamar macroangiopatía diabética. Sus complicaciones, bajo la forma de un aumento en la incidencia de accidentes cardiovasculares, son bien conocidas a través de los ya clásicos estudios epidemiológicos del *Diabetes Complications and Control Trial (DCCT)*⁽⁵¹⁾ y el *United Kingdom Prospective Diabetes Study Group*⁽⁵²⁾. En efecto, el riesgo de infarto agudo de miocardio es, en pacientes diabéticos, entre 2 y 10 veces superior, aumentando el de AVC entre 2 y 3 veces⁽⁵³⁾.

Los factores que inducen a esta potenciación de la aterogénesis no son bien conocidos, aunque la resistencia a la insulina y la dislipemia asociadas parecen ser determinantes. Por otra parte, y contrariamente a lo observado en la microangiopatía diabética, su efecto es, hasta cierto punto, independiente de los niveles de glucemia.

La resistencia insulínica, presente en la DM tipo 2, así como en algunos individuos con DM tipo 1 con sobrepeso, se ha asociado con tasas más altas de calcificación coronaria al compararlos con individuos no diabéticos⁽⁵⁴⁾.

En condiciones normales, existe un equilibrio entre los mecanismos de reparación y proliferación celular controlados por los genes que regulan la entrada en el ciclo celular (proto-oncogenes) y los sistemas protectores antitrombogénicos como la óxido-nítrico sintetasa. Este balance depende de la correcta señalización desde el receptor de la insulina y su transmisión a través de dos vías de fosforilación (MAP-quinasa y fosfato de inositol) que se ven alterados en la diabetes por falta de insulina o por resistencia a la misma⁽⁵⁵⁾.

La dislipemia no es más frecuente en los pacientes con diabetes tipo I, mientras que la II se asocia con un perfil aterogénico caracterizado por un descenso de las HDL y



elevación de las LDL que se relaciona de forma lineal con un aumento en la incidencia de accidentes cardiovasculares. En contraposición, el aumento progresivo de los niveles de Hb glicosada apenas afecta dicha incidencia. No obstante, de nuevo el control glucémico no parece mejorar la tasa de recurrencia ni la supervivencia a largo plazo. Solo el control de las cifras tensionales parece prevenir la incidencia de AVC en estos pacientes⁽⁴⁹⁾.

También se han investigado los niveles séricos de factores implicados en la osteoregulación y en la calcificación vascular (como la vitamina D y la PTH) en relación a otros factores de riesgo como la diabetes. Sólo la 1,25-vitamina D se asocia a la calcificación coronaria presentando un efecto protector a pesar de la acción propia de la vitamina D en la regulación de los depósitos de Ca⁽⁵⁶⁾. En pacientes con diabetes tipo 2 y una tasa de excreción urinaria de albúmina elevada, Joergensen y cols.⁽⁵⁷⁾ observaron que una deficiencia severa de vitamina D (<12,5 nmol/L) se asociaba con un aumento de las posibilidades de calcificación coronaria (OR 4,3), relación que se mantenía tras un ajuste por edad, sexo, colesterol total, creatinina, Hb glicosilada, presión arterial sistólica y tabaquismo.

1.3.3 ALTERACIONES LIPÍDICAS

La lipemia se ha sugerido como posible modulador de la calcificación. Así, se ha comprobado, mediante estudios *in vivo*, una asociación directa de los niveles de colesterol total y colesterol-LDL con la calcificación coronaria cuantificada mediante TC, y una asociación inversa con los niveles de HDL^(58, 59).

Por otra parte, las dietas hipolipemiantes y los tratamientos con estatinas han mostrado una disminución en la calcificación vascular. Callister y cols.⁽⁶⁰⁾ estudiaron

mediante TC el volumen de calcio (índice de volumen) en las lesiones coronarias de 149 pacientes, de los cuales 105 fueron tratados con estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa). Su reevaluación a los 12 meses demostró una modesta reducción del 7% sólo en los pacientes tratados que habían alcanzado niveles de LDL por debajo de 120mg/dl. Además, se observó un aumento significativo en los pacientes tratados con estatinas, pero con LDL por encima de dicho umbral, y un aumento máximo del 52% en los no tratados. Por otro lado, existen estudios que relacionan las estatinas con la calcificación de las células mesenquimales y las CMLs. Esta diferenciación osteoblástica se basa en el incremento de la expresión del mRNA de BMP-2. Estos efectos, serían dosis dependiente⁽⁶¹⁾. Saremi y cols.⁽⁶²⁾ analizaron la progresión de la calcificación coronaria en un grupo de pacientes con diabetes tipo 2 y AE avanzada con un seguimiento medio de 12 años. Encontraron que aquellos pacientes con un consumo mayor de estatinas presentaban una progresión acelerada en la calcificación coronaria estadísticamente significativa. Esta significación se mantenía tras el ajuste con diversos factores de riesgo cardiovascular (FRCV).

Las estatinas no sólo pueden actuar sobre la calcificación de las arterias, sino que también pueden alterar el metabolismo óseo. De hecho, sabemos que la calcificación arterial y la osteoporosis comparten algunos de sus mecanismos patogénicos. Parhami y cols.⁽⁶³⁾ analizaron el efecto de la LDL oxidada en las CMLs de la pared vascular y en células preosteoblásticas del hueso (MC3T3-E1) utilizando como marcador de diferenciación osteoblástica la expresión de la fosfatasa alcalina (FA). Los resultados mostraron un aumento dosis dependiente de la FA en las CMLs tratadas con LDL oxidada en comparación con las células control, apreciándose, en cambio, el efecto inverso en el caso de las células MC3T3-E1.



La leptina, una proteína implicada en el metabolismo de los lípidos y en el remodelado óseo, podría estar también relacionada con estos procesos de calcificación arterial, como sugiere la elevación de sus niveles plasmáticos en pacientes con coronariopatía. Reilly y cols.⁽⁶⁴⁾ encontraron, en pacientes diabéticos, una asociación entre los niveles plasmáticos de leptina y la calcificación coronaria (mediante TC de haz de electrones, EBCT), tras ajustar por índice de masa corporal y proteína C-reactiva. Tanto la leptina como su receptor se han identificado en CMLs, células endoteliales y células espumosas de las lesiones AE, aunque no se conoce cuál sería su papel en el desarrollo de la AE y la calcificación arterial. Hamrick y cols.⁽⁶⁵⁾ observaron que ratones con delección del gen de leptina (*ob/ob*) o del gen de su receptor (*db/db*) desarrollaban menos áreas de AE en comparación con los controles, pudiendo deberse parcialmente al aumento de HDL que producía también esta alteración genética. Este efecto favorecedor de la calcificación, provocado por la leptina, puede deberse también a su acción pro-inflamatoria y a la inducción de la diferenciación osteogénica que provoca en las CMLs. Otros estudios apuntan a que las CMLs de la pared arterial, al ser tratadas con leptina presentan un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (marcador de diferenciación osteogénica) entre 5 y 10 veces, y que los tratamientos prolongados aumentan la calcificación del tejido vascular⁽⁶⁶⁾.

Estos estudios indican una relación entre metabolismo lipídico y calcificación arterial. No obstante, su verificación requeriría de nuevos diseños prospectivos para intentar desligar este efecto del mediado por el propio proceso aterogénico.

1.3.4 INFLUENCIA ESTROGÉNICA

Estudios epidemiológicos previos indican que la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares es mayor en hombres que en mujeres pre-menopáusicas, y que la incidencia tiende a aproximarse cuando éstas superan la menopausia. Además, en mujeres ooforectomizadas se duplica el riesgo de accidentes cardiovasculares.

Los mecanismos por los cuales los estrógenos ejercen un efecto cardioprotector serían:

- Acción indirecta: mejoran el perfil aterogénico. Los estrógenos aumentan la HDL y disminuyen la LDL fundamentalmente cuando se administran por vía oral y, además, mejoran la tolerancia a la glucosa.
- Acción directa: actúan directamente en la pared vascular produciendo vasodilatación. En especial, promueven una acción vasodilatadora mediada por el incremento de óxido nítrico (factor de relajación endotelial). Por otro lado, existe una acción química local, modificando el metabolismo de las prostaglandinas, por incremento de prostaciclina y disminución de tromboxano, lo que conduce a un efecto vasodilatador, inhibiendo el papel vasoconstrictor de la endotelina I.

La mujer postmenopáusica comparada con la premenopáusica, tiene mayor concentración de colesterol total y colesterol LDL. También se observa aumento de triglicéridos plasmáticos, el cual está vinculado con el envejecimiento⁽⁶⁷⁾. Otras lipoproteínas cuya concentración plasmática se incrementa en la menopausia son las Lp(a) y la IDL. El comportamiento del colesterol HDL es más controvertido, según



algunos autores disminuye, en tanto que otros no observan cambios tras la menopausia⁽⁶⁸⁾.

Numerosos estudios han establecido el efecto beneficioso de la terapia hormonal sustitutiva (THS) sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas en las mujeres postmenopáusicas. Los estrógenos por vía oral han sido los más utilizados en la sustitución hormonal tanto a corto como a largo plazo y su primer metabolismo hepático determina una actividad enzimática y modificaciones metabólicas importantes:

- Disminución de la concentración plasmática de IDL y LDL, por incremento de su catabolismo, a través del aumento en la actividad del receptor para la LDL, hasta valores similares a los de una mujer premenopáusica.
- Disminución de la Lp(a).
- Incremento de la Apo A1, disminución de la síntesis de lipasa hepática e inhibición de los receptores SR-B1. Estos efectos determinan el aumento de la HDL fundamentalmente a expensas de HDL 2.

A pesar de este efecto protector cardiovascular pleiotrópico de los estrógenos, y su análisis en diversos ensayos clínicos, no hay una evidencia clara sobre la reducción de la aterogénesis coronaria o la disminución de las complicaciones cardiovasculares de la THS^{(69),(70)}. La influencia de la THS sobre el sistema cardiovascular plantea controversia y todo parece indicar que sus efectos estarán marcados por la presencia de FRCV previos, el tipo de fármaco empleado en el tratamiento o el tiempo de duración de éste.

En los últimos años se ha estudiado el efecto de la THS sobre la calcificación arterial. Concretamente sobre el eje OPG/RANK/RANKL. La OPG está asociada a los

procesos de reabsorción ósea y calcificación vascular, y podría ayudar a entender la alta prevalencia de la AE y la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Los niveles en suero de OPG serían un predictor potencialmente útil de las alteraciones vasculares adversas que se dan de manera precoz en mujeres postmenopáusicas⁽⁷¹⁾.

El efecto antiaterogénico de los estrógenos se ha estudiado en diversos modelos animales. Bourassa y cols.⁽⁷²⁾ analizaron el efecto del 17- alfa- estradiol y el tamoxifeno en la progresión de la placa de AE en un modelo de rata con delección selectiva del gen de la ApoE, y observaron que tanto los estrógenos endógenos como exógenos protegían de la formación y progresión de la AE.

Sin embargo, la débil asociación entre la extensión de las lesiones y los niveles de colesterol y triglicéridos encontrado en los modelos animales, lleva a pensar que el efecto protector de los estrógenos sólo está parcialmente ligado a la disminución lipídica que producen. Elhage y cols.⁽⁷³⁾ también utilizaron un modelo animal con ratas con delección del gen codificante de ApoE (ApoE -/-), a los que aplicaron diferentes dosis de estradiol (E2), encontrando una disminución de los niveles de colesterol y del área de lesión. La asociación hallada entre el área de la lesión y los niveles séricos de E2 sugería una acción directa de los estrógenos sobre la pared arterial y no sólo mediante la disminución del colesterol plasmático. Otros modelos animales estudiados parecen coincidir en que el efecto protector de los estrógenos no depende únicamente de la disminución sérica de lípidos, sino que su acción se produce directamente en la pared arterial mediante la producción de moléculas vasoactivas y citoquinas⁽⁷⁴⁾.

Los estrógenos son esenciales para la maduración esquelética -incluso en el varón- y no sólo en la época de crecimiento, sino también en el adulto, manteniendo el equilibrio del recambio óseo del esqueleto⁽⁷⁵⁾. Los estrógenos, a través de su acción



sobre el TGF- β , serían estimuladores osteoblásticos; aumentan la producción de calcitonina e impulsan la expresión de receptores de vitamina D₃ en osteoblastos, reducen la producción de citoquinas proinflamatorias e incrementan la expresión de la OPG. Así mismo, inducen la apoptosis de los precursores y las formas maduras de las células osteoclasticas. El descenso de los niveles de estrógenos en la menopausia se acompaña de un incremento de la reabsorción ósea. Esto se cree que es debido al incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-1, IL-6 y TNF α ⁽⁷⁶⁾ y la disminución de la actividad endotelial de la óxido nítrico sintetasa (ONs)⁽⁷⁷⁾, mediada a través del receptor de estrógenos α (ER- α), y que provoca el aumento de síntesis local de óxido nítrico (ON). Sin embargo, la interacción de los estrógenos con la ONs, y su influencia en la aterogénesis, no ha sido estudiada *in vivo* hasta el momento, aunque estudios en animales sugieren que la ONs no sólo tiene efecto en los vasos, sino que también tiene un papel en el metabolismo óseo, como demuestra estudios *in vitro*⁽⁷⁸⁾.

Con el cese de la función ovárica se tiene una pérdida rápida de hueso de un 2-4% anual en los primeros 5 años siguientes a la menopausia, pérdida anual muy superior al 1% que se da durante el envejecimiento⁽⁷⁹⁾. La alteración de los niveles de la interleukina y su repercusión sobre la masa ósea, también se ha relacionado con la edad y la menopausia⁽⁸⁰⁾.

La inducción de estas citoquinas pro-inflamatorias, añadida a la pérdida de estrógenos tras la menopausia, parece relevante para explicar la vertiente inflamatoria de la aterogénesis. Estas tres citoquinas se producen en el tejido vascular y su relación con la AE se ha demostrado en diferentes estudios *in vivo*⁽⁸¹⁾. Sin embargo, la

contribución precisa al efecto aterogénico de los estrógenos no ha sido aclarada por el momento.

1.4 PATOGÉNESIS

La calcificación intimal ha demostrado numerosas similitudes con el proceso de osteogénesis, tanto a nivel histológico como celular y bioquímico⁽⁸²⁾. Se han propuesto diversas teorías para explicar este fenómeno que algunos consideran ectópico y patológico, mientras que para otros obedecería a un mecanismo adaptativo/defensivo. Entre ellas destacan los modelos físico-químico o pasivo, osteogénico activo y genético (determinantes genéticos). Éstos no son necesariamente excluyentes, sino más bien complementarios. Los estudios realizados en este ámbito se limitan al análisis de la expresión de proteínas y genes relacionados con el metabolismo óseo, o extrapolaciones a partir de ensayos *in vitro* en cultivos celulares. Sin embargo, faltan por el momento estudios que analicen estos mecanismos *in vivo*.

1.4.1 MECANISMOS MOLECULARES DE FORMACIÓN Y REABSORCIÓN ÓSEA

Una adecuada aproximación al proceso de calcificación arterial requiere el conocimiento y comprensión de los mecanismos que regulan la formación y reabsorción ósea.

Los elementos celulares artífices del proceso de osificación, ya sea directa (mesenquimal) o a través de cartílago intermediario (encondral), provienen aparentemente de un precursor común. Sin embargo, en un estadio de diferenciación posterior, osteoblastos y condrocitos parecen compartir un precursor mesenquimal, mientras que los osteoclastos proceden de la línea hematopoyética. El proceso está



orquestado a través de programas genéticos responsables de la expresión de múltiples citoquinas y factores de transcripción. En las Fig. 1.2 y 1.3 se muestran de forma esquematizada el control molecular en la diferenciación y activación tanto osteoclástica como osteoblástica.

En la diferenciación y activación osteoclástica (Fig. 1.2) interviene el factor estimulante de las colonias de tipo monocito macrófago (M-CSF). Posteriormente, la expresión de RANK en la membrana caracteriza definitivamente a la población que va a diferenciarse en osteoclasto. Cuando este receptor se une a su ligando (RANKL), la célula precursora comienza su maduración, convirtiéndose en una célula multinucleada y polarizada con capacidad resortiva. Con la activación del RANK se genera una señal intracelular en la que interviene el factor adaptador TRAF6 y tras una serie de cascadas paralelas se activarán NF- κ B, c-Fos, fosfolipasa C y NFATc1⁽²¹⁾.

El origen clásico del RANKL se sitúa en los osteoblastos (OB), aunque sabemos que son los osteocitos (OS) los que aportan una mayor cantidad de esta citocina, y podrían ser los verdaderos reguladores de la resorción ósea, al menos en condiciones fisiológicas. Linfocitos T y B, también son productores de RANKL, pero posiblemente su papel tendría relevancia en situaciones patológicas. De forma fisiológica el IFN- γ segregado por linfocitos T inactiva al TRAF6, el factor adaptador principal de la señal intracelular de RANK, lo que constituye un factor regulador relevante para impedir una sobre activación osteoclástica provocada por el RANKL linfocitario⁽⁸³⁾.

La formación ósea depende del reclutamiento de un número suficiente de OB en las superficies que han sido sometidas al ataque de los osteoclastos (OC). Proceden de un subgrupo de células madre mesenquimales con capacidad de diferenciación osteogénica. Aunque la localización exacta de estas células in vivo no se conoce,

recientes estudios sugieren que podrían situarse en la superficie externa de los sinusoides medulares, alcanzando las superficies óseas a través de canales vasculares en respuesta a señales procedentes de los sitios de remodelado, bien de la matriz reabsorbida o de los propios OC activos⁽⁸⁴⁾. Una vez situados en la superficie ósea, los OB producen la matriz orgánica (osteoide) y finalmente mueren por apoptosis o quedan en la matriz calcificada, transformándose en OS.

El regulador más importante en la diferenciación osteoblástica es Runx2, factor necesario, pero no suficiente para que una célula progenitora se diferencie. En un estadio más avanzado intervienen otros factores, como PTH/PTHrP, GH/IGF-1 y la vía Wnt. La ruta de señalización Wnt (también conocida como vía Wnt canónica) constituye un mecanismo esencial en la regulación del remodelado óseo e implica el correcto funcionamiento de diversos factores conectados entre sí, siendo capaz de ejercer un control global sobre el osteoblasto, favoreciendo su proliferación, diferenciación o la apoptosis. La vía Wnt funciona en combinación con otros factores como las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs)⁽⁸⁵⁾. Las BMPs pertenecen a la superfamilia de ligandos TGF- β ⁽⁸⁶⁾ y son los factores osteogénicos más potentes que se conocen en la actualidad. Las BMPs parecen jugar un papel importante en las patologías vasculares⁽⁸⁷⁾. Se han descrito 2 tipos de receptores específicos tipo Kinasa serina/treonina. La formación de complejos heteroméricos entre los receptores tipo I y II inicia la transmisión citoplásmica de la señal de transfosforilación a través de proteínas Smads hasta su translocación final al núcleo donde se inicia la activación de distintos genes por mecanismos no bien comprendidos. Por otra parte, la transmisión de la señal de fosforilación a través de distintas combinaciones de factores de transcripción parece ser responsable de la diferenciación del precursor mesenquimal



hacia su destino final. En esta compleja cascada de transmisión intracelular de la señal provocada por las BMPs, tres factores de transcripción (Dlx5, Runx2/Cbfa-1 y Osx) parecen tener la llave de la diferenciación osteoblástica, como sugiere su inactivación total en ratones con delección selectiva de los respectivos genes.

En el proceso de remodelado óseo, los OS juegan un papel relevante. Estas células son las más abundantes (90-95%) del tejido óseo y las más longevas, pues pueden alcanzar los 25 años de supervivencia⁽⁸⁸⁾. Los OS poseen multitud de dendritas que se distribuyen por el tejido circundante y alcanzan la superficie, utilizando canaliculos por los que circulan pequeñas moléculas, como el óxido nítrico y las prostaglandinas, que participan en una extensa red de señalización que empieza a ser reconocida como una parte fundamental del control del remodelado óseo. Su actividad secretora es intensa (RANKL, OPG, ATP, PGE₂, óxido nítrico, FGF23 y la DMP-1)⁽⁸⁹⁾. Como ya hemos comentado anteriormente, la vía Wnt/ β -catenina también posee un papel destacado en la remodelación ósea. La Wnt son unos ligandos naturales, que unidos a la membrana celular, desencadenarían acciones intracelulares que conducen a la liberación de la β -catenina. Ésta llega al núcleo e interacciona con miembros de la familia de factores de transcripción TCF/Lef provocando la síntesis de proteínas que intervienen principalmente en la osteoformación. En esta vía los osteocitos intervendrían mediante secreción de esclerostina, potente inhibidor de la vía Wnt⁽⁹⁰⁾.

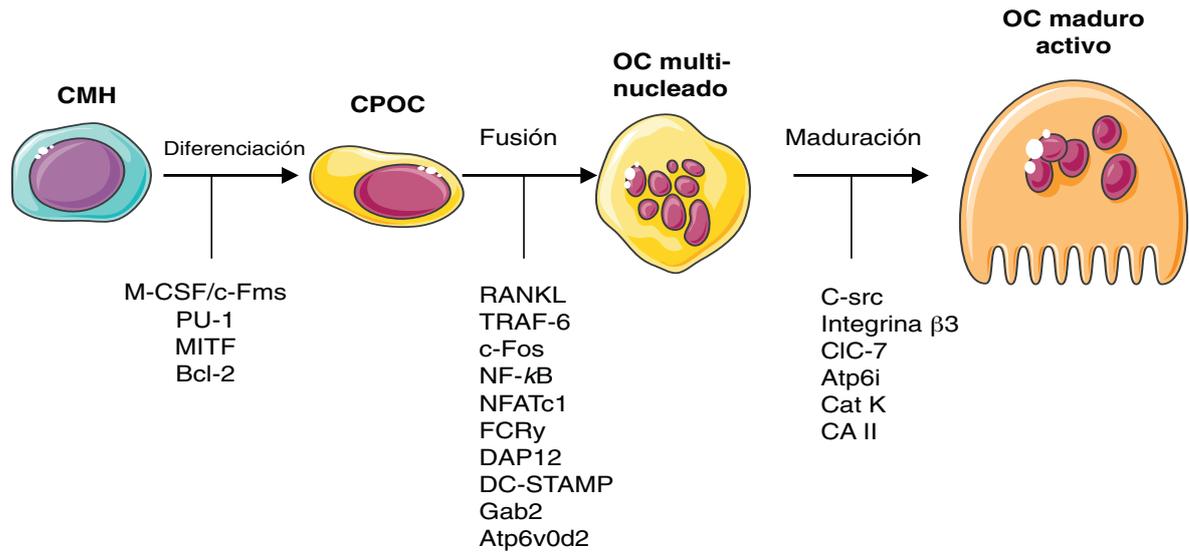


Figura 1.2 Diferenciación osteoclástica. CHM: célula madre hematopoyética; CPOC: cél. precursora de osteoclastos; OC: osteoclasto. Arbolea y cols. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2013.02.008>⁽²¹⁾

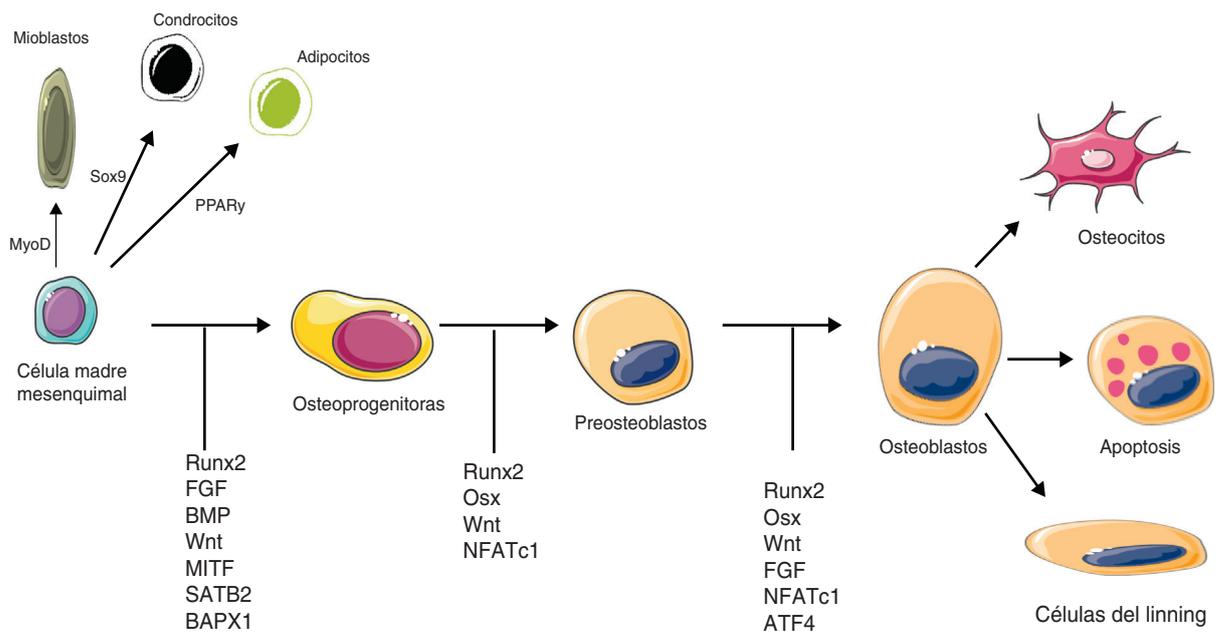


Figura 1.3 Diferenciación osteoblástica. MyoD: *myogenic differentiation 1 protein*; PPAR γ : *peroxisome proliferator activated receptor gamma*; Sox9: *sex determining region Y-box 9*. Arbolea y cols. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2013.02.008>⁽²¹⁾



El remodelado óseo se produce en zonas compuestas por una cohorte funcional de células que actúan de forma coordinada, denominada osteona o unidad multicelular básica y que contiene OC, OB, OS, células de la superficie ósea (*lining*) y células de los capilares de soporte⁽⁹¹⁾. El ciclo se estructura en 4 fases consecutivas (Fig. 1.4). Inicialmente tiene lugar el reclutamiento de precursores de OC hacia un lugar de la superficie quiescente, en la superficie trabecular o en la profundidad de una osteona. Luego, los OC maduros activan su maquinaria resortiva y labran una laguna (laguna de *Howship*), que en la siguiente fase será rellenada por la colaboración de células de estirpe macrofágica con las células del *lining*, lo que permitirá acudir a los OB maduros que cubrirán la cavidad de sustancia osteoide. Finalmente, se producirá la mineralización y la formación de hueso maduro.

Los osteoclastos, que representan tan sólo en 1-2% de las células óseas, pertenecen a la estirpe monocito-macrófago. En su estado maduro tiene la capacidad de unión al hueso a través de las integrinas $\alpha\nu\beta3$ que se expresan en la superficie de los podosomas (prolongaciones digitales de la membrana celular en forma de “cepillo”) y que tienen la propiedad de interactuar con proteínas de la matriz, como la OPN y la vitronectina, y que permitirá el intercambio de iones y proteasas necesario para la reabsorción ósea⁽²¹⁾.

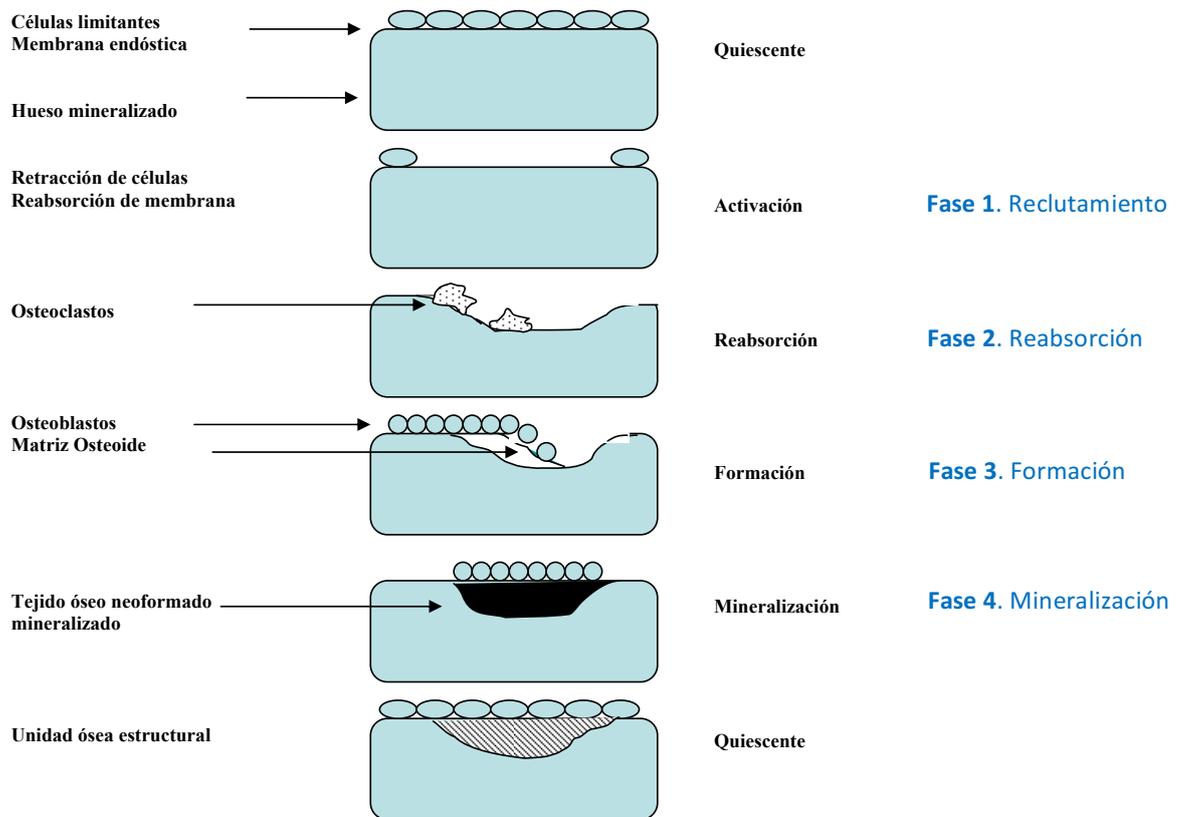


Figura 1.4 Fases del remodelado óseo. Modificado de Compston y cols. *Physiol Rev.* 2001⁽⁹²⁾

La función de reabsorción ósea de los osteoclastos está mediada por diversas proteasas, entre las que destaca catepsina K. Estas enzimas requieren un pH bajo para ejercer su acción. Este microambiente de acidosis localizada en la laguna osteoclástica depende, en gran parte, de la acción de una bomba de protones acoplada a un canal iónico: el ClC7, que intercambia 2Cl^- por un H^+ ⁽⁹³⁾. Su acción coordinada conlleva la generación de ácido clorhídrico capaz de disolver la hidroxiapatita, a la vez que generar las condiciones óptimas para la acción lítica de la catepsina K (liberada desde los lisosomas) y diversas metaloproteasas sobre la matriz extracelular.



1.4.2 PATOGÉNESIS DE LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL

1.4.2.1 Modelo osteoblástico o activo

El modelo originalmente propuesto por Brostöm y cols.⁽⁹⁴⁾ se basa en la identificación en la pared arterial de células pluripotenciales (células vasculares calcificantes [CVCs]) que expresan proteínas características de fenotipo osteogénico (osteopontina, osteocalcina, fosfatasa alcalina y BMP-2). Si las CVCs representan por sí mismas el precursor o son CMLs con características osteoblásticas, es todavía incierto. Esta segunda hipótesis se ve reforzada por la identificación en CMLs de la expresión de Runx2/Cbfa1, así como por la posibilidad de inducir su desviación fenotípica hacia un perfil osteoblástico bajo diversos estímulos, como son los subproductos de la oxidación lipídica, la respuesta inflamatoria que producen y las concentraciones elevadas de Ca y p^(95, 96).

Otros estudios se han focalizado en la alteración de la reabsorción de Ca por células tipo OC como origen de estos depósitos. De hecho, la interferencia de la vía de señalización para la diferenciación y activación osteoclástica (RANKL, su receptor de superficie celular [RANK] y su receptor señuelo, OPG) conduce a la inactivación osteoclástica y desarrollo de calcificaciones en la pared vascular^(97, 98) (Fig. 1.5).

El papel de la OPG en los mecanismos de calcificación arterial merece especial atención, sobre todo porque algunas evidencias la relacionan con la osteoporosis. La asociación paradójica de ambos procesos, especialmente en mujeres postmenopáusicas y edad avanzada, ha centrado la atención de los investigadores⁽⁹⁹⁾. Choi y cols.⁽¹⁰⁰⁾ encontraron en las arterias, al contrario que en el hueso, un aumento

de la relación OPG/RANKL, en respuesta a la ooforectomía, lo que sugiere la importancia de los efectos endocrinos en la asociación de la destrucción ósea y la mineralización arterial en mujeres postmenopáusicas.

Este efecto se ha constatado en ratones con delección selectiva del gen de la OPG (OPG^{-/-}), en los que se produce calcificación arterial masiva asociada a osteoporosis⁽¹⁰¹⁾. En este modelo animal, la osteoporosis, pero no la calcificación vascular, es reversible tras la administración exógena de OPG recombinante⁽¹⁰²⁾. Aunque diversos estudios sugieren que la OPG tendría un efecto inhibitorio de la calcificación, se han encontrado concentraciones elevadas de OPG en pacientes con calcificación arterial. La explicación se podría encontrar en las interacciones que alteran las vías de producción de OPG, como la inflamación. Así, mediadores proinflamatorios como el TNF- α son capaces de inducir la expresión de OPG en las células musculares lisas y las células endoteliales, pero también estarían implicados en el desarrollo de la calcificación vascular mediante la inducción de fosfatasa alcalina. Es decir, agentes que estimulan la calcificación de las células musculares lisas, también pueden estimular la producción de OPG, posiblemente como un mecanismo compensatorio de protección. Alteraciones de la función miocárdica, roturas de la placa y procesos inflamatorios en otros tejidos pueden contribuir a incrementar los niveles de OPG circulante⁽¹⁰³⁾.

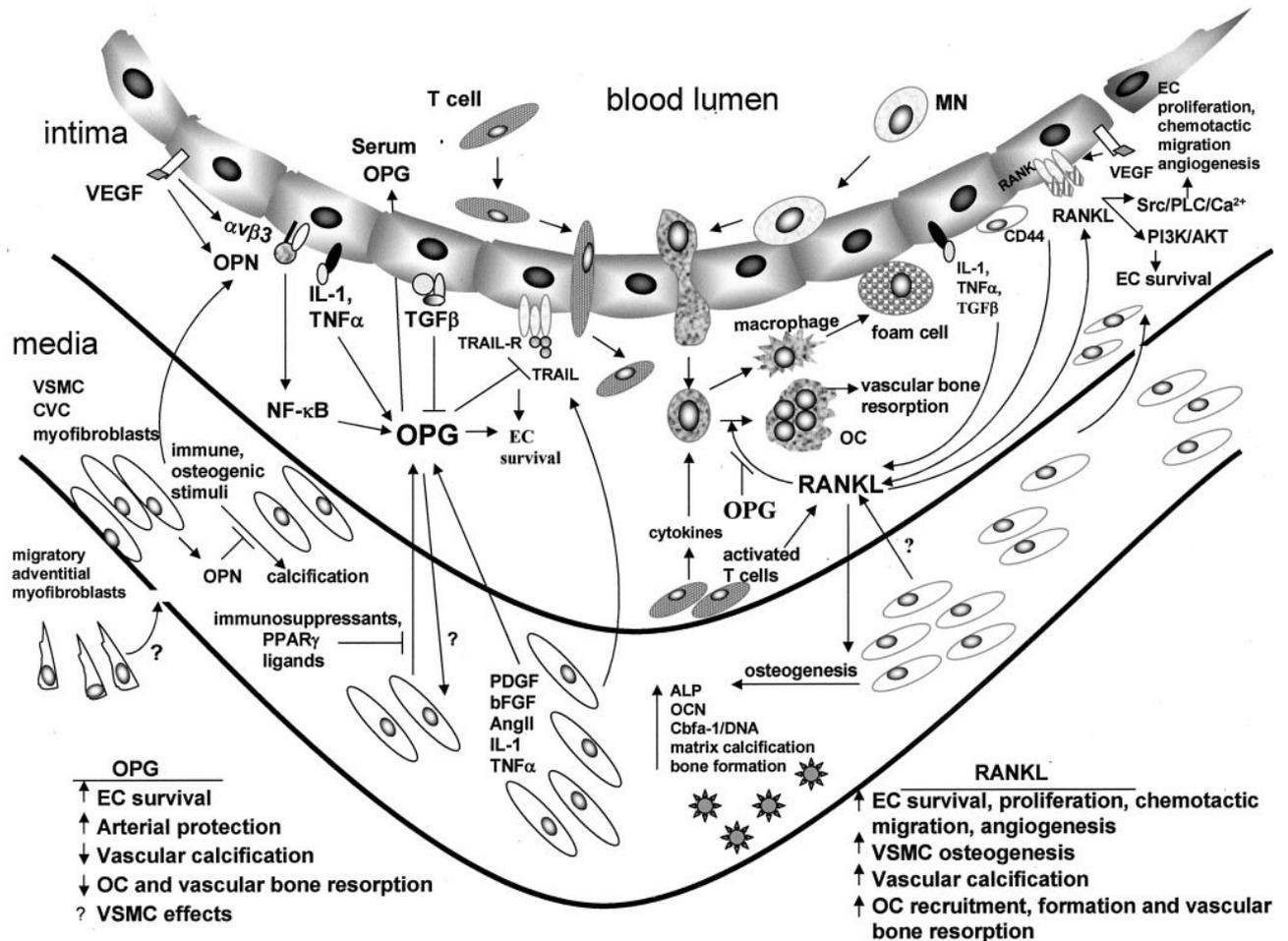
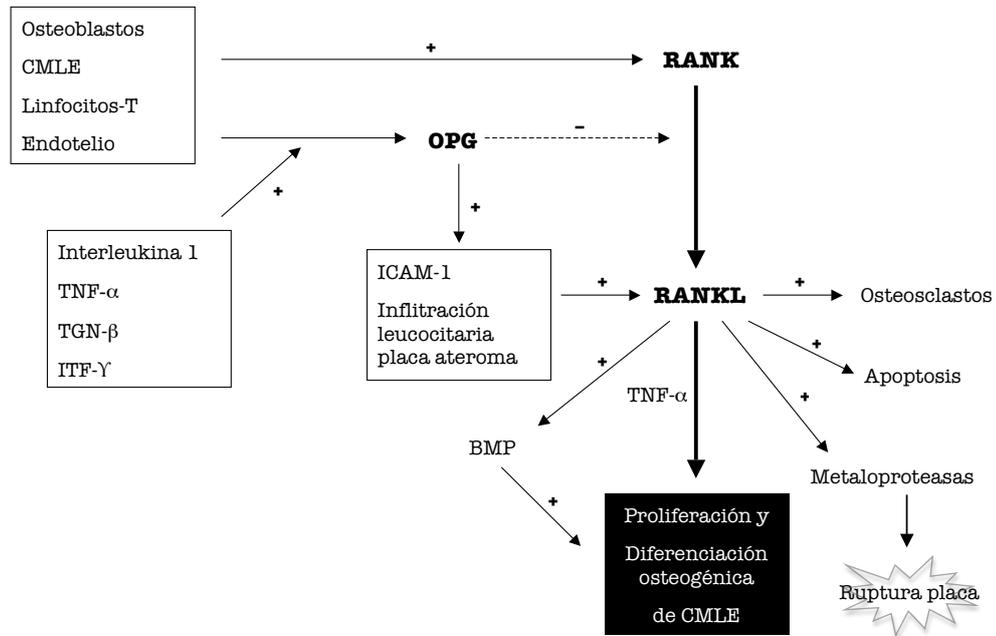


Figura 1.5 Esquema de la expresión, regulación y función del RANKL, RANK y OPG en la calcificación vascular arteriosclerosis. RANKL soluble o asociado a la membrana puede ser producido por células endoteliales (ECs) estimuladas por citoquinas inflamatorias, células T activadas, células de músculo liso vascular (VSMCs) sometidas a diferenciación osteogénica o ECs en contacto con VSMCs que expresan CD44. Al interactuar con el receptor RANK, RANKL podría contribuir al proceso aterosclerótico a través de: (1) activar la supervivencia, proliferación, migración quimiotáctica o angiogénesis de EC; (2) estimulación de la actividad de los monocitos MMP-9, trans migración a través de la barrera endotelial y desarrollo en osteoclastos (OCs) que reabsorben el hueso en lesiones avanzadas; (3) promover un programa de diferenciación osteogénica en VSMC que conduce a la síntesis de proteínas óseas y calcificación de la matriz dentro del vaso arterial. La OPG, un receptor señuelo soluble que antagoniza las acciones de RANKL en el tejido óseo, es producido por VSMCs y puede ser inducido por moduladores inflamatorios y ECs. La OPG también se genera por ECs y puede servir como una señal de supervivencia de éstas para oponerse a las acciones proapoptóticas producidas por VSMCs ateroscleróticas. Los niveles elevados de OPG pueden, por un lado, ayudar a proteger contra el daño arterial y la calcificación vascular, y por otro reflejan un estado general de disfunción de las ECs, aumentando en el suero de pacientes con enfermedades asociadas con la calcificación vascular, representando posiblemente intentos contrareguladores para compensar los efectos de un RANKL aumentado. Tomado de Collin-Osbody. *Circ Res.* 2004⁽¹⁰⁴⁾.

En la Fig. 1.6 se representa el eje RANK-RANKL-OPG y su papel en la promoción de la diferenciación osteocondrogénica de las células musculares lisas ante una situación de inflamación de la placa AE.



CMLE: celular muscular lisa endotelial; TNF-α: tumor necrosis factor alfa; TGN-β: transforming growth factor beta; ITF-γ:interferón gamma;OPG: osteoprotegerina; ICAM-1: intracelular adhesión molecule-1; BMP: bone morphogenetic proteins

Figura 1.6 Eje RANK-RANKL-OPG. Mecanismo de calcificación vascular.

Aunque el modelo osteogénico no ha sido completamente demostrado *in vivo*, los estudios anteriormente citados, junto a la demostración, mediante métodos inmunohistoquímicos, de la presencia de diversas proteínas del metabolismo óseo en las placas calcificadas^(105, 106), sugieren de forma firme, un vínculo entre ambos mecanismos.



1.4.2.2 Modelo físico-químico o pasivo

Los fluidos extracelulares presentan cationes calcio (Ca^{2+}) y aniones fosfato (PO_4^{3-}) y carbonato (CO_3^{2-}) en solución. Éstos se encuentran en equilibrio metaestable dependiendo de su concentración, siendo su producto de solubilidad el factor determinante de su precipitación bajo la forma de fosfato y carbonato cálcico. El modelo físico-químico, se basa en la existencia, en la pared arterial, de inhibidores que previenen la precipitación de dichas sales⁽¹⁰⁷⁾.

Entre estos inhibidores, destacan varias proteínas del grupo Gla, capaces de modular la precipitación de sales cálcicas en los fluidos extracelulares por quelación o unión de iones Ca^{2+} ⁽¹⁰⁸⁾. Estas proteínas contienen ácido γ -carboxiglutámico, es decir, un residuo anormal de glutamina con un grupo carboxilo añadido en posición γ y están relacionadas, no sólo con la hemostasia y formación de trombina, sino también con la deposición de calcio y el metabolismo óseo. La proteína de la matriz Gla (MGP, *matrix Gla protein*) y la BGP (*bone Gla protein*), también llamada osteocalcina, pertenecen a éste grupo y, aunque su actividad se desarrolla principalmente en el hueso, se ha demostrado también su expresión en el tejido arterial⁽¹⁰⁹⁾.

Distintos cofactores parecen ser los moduladores de su actividad. Así, por ejemplo, al menos dos formas de vitamina K pueden actuar en la reacción que produce Gla: la filoquinona (K1) y la menaquinona (MK-4). Ambas tienen un efecto similar como cofactor *in vitro*. Sin embargo, Spronk y cols.⁽¹¹⁰⁾ observaron, en un modelo animal, que la MK-4, a diferencia de la K1, inhibía la calcificación arterial inducida por warfarina. La diferente distribución y eficiencia de las coenzimas K1 y MK-4 en los tejidos podría explicar, al menos en parte, por qué algunos tienden a calcificarse y otros no.

Por otra parte, estudios realizados con animales de experimentación han permitido relacionar el proceso de calcificación vascular con la deficiencia de la MGP en la pared arterial. Así, se ha observado calcificación arterial masiva en modelos de ratones con delección selectiva del gen de la MGP o de la γ -carboxilasa⁽¹¹¹⁾.

La OPN es una fosfoproteína implicada en la regulación de la mineralización al actuar estimulando los osteoclastos e inhibiendo el crecimiento de los cristales de hidroxapatita. Aunque no se encuentra en arterias normales, algunos autores han detectado su expresión en áreas de calcificación arterial⁽¹¹²⁾. Esta proteína se expresa en diferentes zonas y tipos celulares como matriz ósea, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, células de músculo liso o células epiteliales⁽¹¹³⁾. Wada y cols.⁽¹¹⁴⁾ mostraron cómo el tratamiento con OPN inhibía la calcificación en tejido aórtico bovino. Sin embargo, no encontraron disminución en los niveles de fósforo o en la actividad de la fosfatasa alcalina, de lo que se deduce que el mecanismo inhibitorio de la OPN se debe a la quelación o secuestro del calcio, siendo su actividad dosis dependiente. Giachelli y cols.⁽¹¹⁵⁾ para examinar el papel de OPN en la calcificación vascular cruzaron ratones OPN^{-/-} (sin manifestaciones vasculares) con ratones MGP^{-/-} (sí desarrollan calcificaciones vasculares). Los ratones OPN^{-/-} y MGP^{-/-} muestran una calcificación más acelerada que los que solo son deficientes en MGP (OPN^{+/+} y MGP^{-/-}), por lo que estos estudios indicarían que OPN es un inhibidor inducible de la calcificación vascular *in vivo*.

La unión de la OPN al calcio, impidiendo su nucleación, y a los cristales de apatita, evitando su crecimiento, parece estar mediada por las capacidades adhesivas del dominio Arg-Gly-Asp de esta proteína. La interacción de este dominio con una integrina alfa-V beta-3 de los precursores osteoblásticos, hace que éstos se diferencien



hacia osteoclastos con fenotipo reabsortivo⁽¹¹⁶⁾. En las placas AE, la producción de OPN por parte de los macrófagos parece que podría responder a un mecanismo defensivo frente a la calcificación, como sugieren Mohamadpour y cols.⁽¹¹⁷⁾, cuyo estudio mostró la asociación entre los niveles plasmáticos de OPN y la presencia de enfermedad arterial coronaria.

1.4.2.3 Modelo unificado

La principal controversia que plantean estos modelos es su aparente validez sólo para explicar predominantemente una de las localizaciones de la calcificación arterial: el pasivo para la medial y el activo para la intimal. Sin embargo, se ha sugerido un solapamiento de ambos, estableciendo el nexo de unión en la capacidad de la MGP (principal estabilizador de la solubilidad de calcio y fósforo en fluidos extracelulares en el modelo pasivo) para inhibir las BMP (principal activador de la osteogénesis en el modelo activo). De hecho, Sweatt y cols.⁽¹¹⁸⁾ demostraron que el dominio Gla de la MGP se une a la molécula de BMP-2 recombinante en presencia de calcio, sugiriendo la hipótesis que la calcificación arterial puede desencadenarse como consecuencia de la afectación de ambas vías en presencia de una pobre carboxilación de la MGP que, a su vez, disminuiría su afinidad por la BMP-2.

Por otra parte, tanto la calcificación medial como la intimal, provocan la sobreexpresión génica de proteínas implicadas tanto en el proceso de diferenciación osteoblástica como en la regulación del proceso de mineralización (sialoproteína, osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina). En base a estas observaciones, Shanahan y cols.⁽¹¹⁹⁾ proponen una hipótesis unificada en la que las CMLs que expresan MGP, sufrirían una modificación fenotípica con desviación hacia un patrón pro-

osteogénico, como consecuencia de factores ambientales que provocan la disminución en la actividad moduladora de la MGP, y que, a su vez, aumentaría la susceptibilidad tisular a la precipitación de sales de calcio.

1.4.2.4 Determinantes genéticos de calcificación arterial

La prevalencia y el contenido de calcio arterial están significativamente ligados a los FRCV conocidos. Sin embargo, estos no explicarían por qué algunos individuos con riesgo elevado nunca desarrollan síntomas y otros con menor riesgo sí lo hacen. Se ha observado que los factores de riesgo establecidos sólo explicarían el 40% de la variabilidad interindividual de la calcificación arterial, y que al menos otro 40% se condiciona por determinantes genéticos⁽¹²⁰⁾.

En el análisis de descendencia y entre hermanos del *Framingham Heart Study*⁽¹²¹⁾, que incluyó 2151 individuos (de 1109 familias), el análisis multivariante sugería que, al menos el 49% de la varianza del índice de calcificación aórtico, se explicaba por el efecto combinado de factores genéticos. Lange y cols.⁽¹²²⁾ compararon la medición de calcio coronario mediante TC con un análisis del genoma en su estudio sobre gemelos de 29 familias. Se genotiparon 370 alelos polimórficos mediante PCR y se estimaron las frecuencias de cada uno. Al contrastar estos datos se encontró que al menos dos *loci* (6p21.3 y 10q21.3) estaban implicados en la calcificación arterial, estimándose que el vínculo familiar (entre gemelos) llevaba asociado un riesgo de 2,22 para el *loci* 6p21.3 ($p=0,0007$) y 3,24 para el *loci* 10q21.3 ($p=0,0005$), respectivamente. Recientemente, en un trabajo multiétnico denominado *Vascular Function and Genetic Epidemiology* (ADVANCE), una región de 58kb del cromosoma 9p21.3 adyacente a los genes tumor



supresores CDKN2A y CDKN2B se asoció con un aumento de la calcificación arterial coronaria en todos los grupos de raza/etnicidad no africana⁽¹²³⁾.

Al igual que en otras enfermedades crónicas, los estudios acerca de la calcificación arterial basados en GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) todavía presentan ciertas limitaciones. Precisar *loci* genéticos que confieren susceptibilidad a la calcificación arterial requiere el manejo de tamaños muestrales de gran escala y de una subdivisión fenotípica precisa (ej. calcificación de la íntima o la media). La implementación de la biología de sistemas a los estudios genéticos futuros sería de gran utilidad para esclarecer los mecanismos de la calcificación arterial. Del mismo modo, la interacción entre los factores genéticos y ambientales también están siendo objeto de estudio en los últimos años⁽¹²⁴⁾. Por otro lado, estudios epigenéticos o de microRNAs también podrían aportar nueva información sobre el proceso de calcificación.

El concepto de que hay diferencias raciales entre los afroamericanos y otros grupos étnicos en los perfiles de expresión genética que contribuirían a una diferencia en el riesgo de calcificación arterial, también merece una mayor atención. Algunos estudios sugieren que, en la raza negra, la calcificación arterial es menor, incluso tras ajustar por factores de riesgo conocidos⁽¹²⁵⁾. No es probable que este hecho pueda explicarse mediante diferencias en la extensión de la AE ya que, a pesar de su menor índice de calcificación, presentan una mayor incidencia de accidentes coronarios.

A pesar de estas evidencias, los estudios para analizar el papel específico de genes candidatos son escasos, e implican genes relacionados, a su vez, con la aterogénesis y otros específicamente involucrados con el proceso de calcificación. En la Fig. 1.7 se

muestran los diferentes factores (ambientales, genéticos y propios del paciente) que a modo de puzzle contribuyen a la calcificación arterial⁽¹²³⁾.

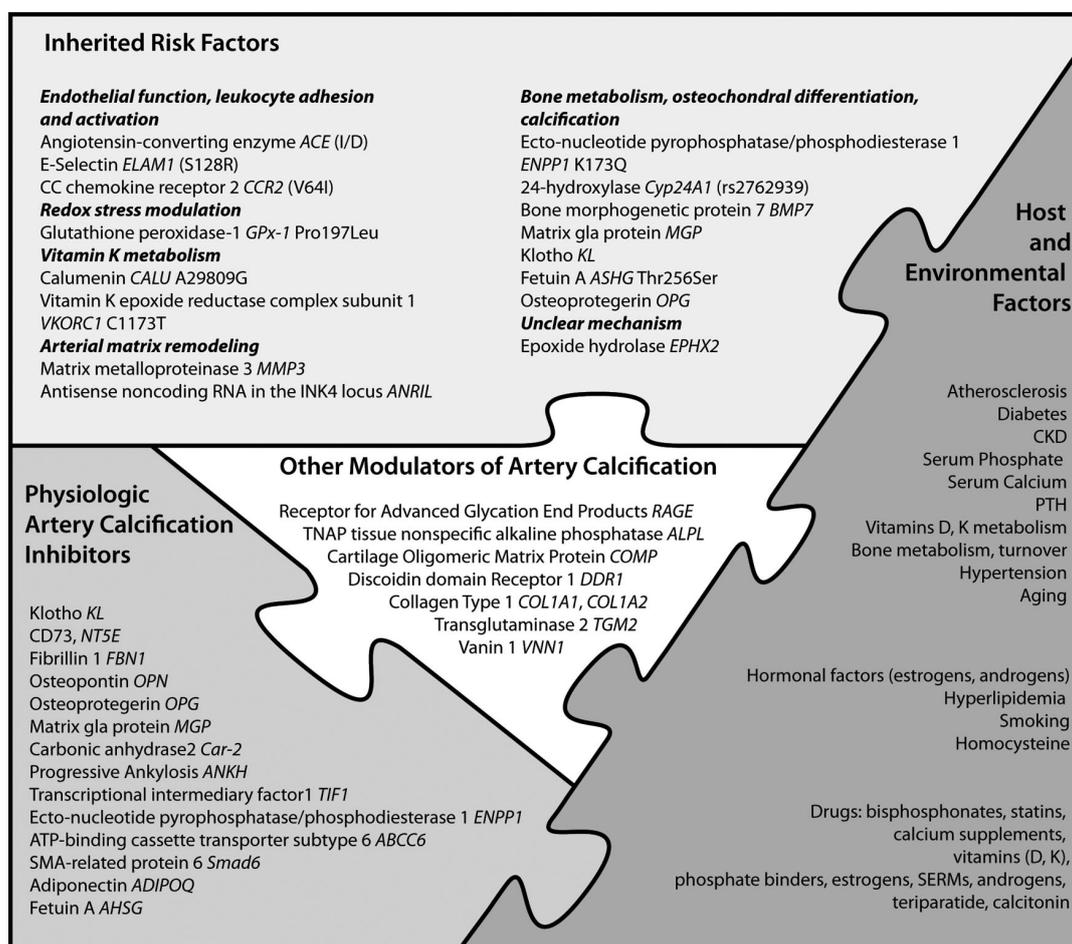


Figura 1.7 Factores implicados en la calcificación arterial. *Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel*. Tomado de Rutsch y cols. *Circ Res.* 2011.⁽¹²³⁾

Se describen a continuación los genes más relevantes implicados en la calcificación arterial:

- Enzima convertidora de la angiotensina (ECA): el sistema renina-angiotensina juega un papel importante en diferentes patologías cardiovasculares. Los diferentes polimorfismos del gen de la ECA han sido ampliamente estudiados y relacionados con la patología oclusiva coronaria⁽¹²⁶⁾. Pfohl y cols.⁽¹²⁷⁾ estudiaron en 146 pacientes que iban a ser sometidos a angioplastia coronaria por angina estable, la relación entre calcificación arterial (mediante ecografía



intravascular) y los polimorfismos inserción/delección (I/D) de la ECA, encontrando que el haplotipo D/D se asociaba con una mayor prevalencia de calcificación. Oei y cols.⁽¹²⁸⁾, en otro estudio, describieron la asociación negativa entre el haplotipo I/D y la calcificación coronaria.

- Apolipoproteína E: La isoforma ApoEε4 se ha relacionado con mayor prevalencia de AE y accidentes cardiovasculares⁽¹²⁹⁾. Se ha buscado también, una posible relación con la calcificación coronaria, pero no se ha demostrado su valor predictivo tras ajustar por otros factores de riesgo conocidos, aunque no se puede descartar su papel modulador sobre los mismos⁽¹³⁰⁾.
- Selectina E: Según un reciente metaanálisis realizado en 24 estudios (3694 casos y 3469 controles), los polimorfismos A561C y G98T del gen de la E-selectina se han relacionado en varios estudios con el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque entre la población caucásica el polimorfismo G98T no se ha observado relación significativa, debido, probablemente, al limitado número de casos y a otros factores confusionales⁽¹³¹⁾.
- Metaloproteinasa de matriz-3 (MMP3): Las MMP-3 pertenece a una familia de endopeptidasas implicadas en mecanismos de formación y resorción de hueso. Los desequilibrios en su expresión o en sus inhibidores han sido relacionados con numerosas patologías, algunas de ellas cardiovasculares⁽¹³²⁾. Bini y cols.⁽¹³³⁾ identificaron, mediante métodos inmunohistoquímicos, la presencia de MMP-2 y MMP-3 en piezas de endarterectomía que habían sido clasificadas previamente como placas tipo V y VI, encontrando que la presencia de MMP-3 aumentaba en las lesiones más calcificadas (50% en las placas tipo V vs 93% en las placas tipo VI), sin apreciarse este aumento en el caso de la MMP-2. El

análisis histológico demostró también la colocalización de la MMP-3 con proteínas de metabolismo óseo (OPN, osteonectina) en los depósitos de calcio. Por otra parte, los resultados del *Helsinki Sudden Death Study*, sugieren la existencia de polimorfismos de la región promotora del gen de la MMP3, que le proporcionan una mayor actividad. Entre ellos, el 6A6SA se ha asociado a un mayor índice íntima-media carotídeo y a una mayor tasa de reestenosis post-angioplastia⁽¹³⁴⁾. Así mismo, el haplotipo 5A5 se ha asociado con un área de calcificación mayor, incluso tras ajustar por factores de riesgo coronario, a pesar de que este estudio no tuvo en cuenta la extensión de las lesiones⁽¹³⁵⁾.

- Proteínas Gla de matriz (MGP): El papel protector de las MGPs frente a la calcificación arterial ha sido referido con anterioridad. En estudios animales con ratón se ha visto que la delección del gen MGP causa extensos cuadros de condrogénesis ectópica, así como calcificaciones arteriales letales⁽¹³⁶⁾. Se han identificado varios polimorfismos de las proteínas Gla implicados. Así, en 2014 Tuñón-Le Poutel y cols.⁽¹³⁷⁾ estudiaron la relación de 3 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), MGP138T>C, -7G>A, y Thr83Ala MGP, con la pérdida de masa ósea y la progresión de la calcificación aórtica en una población de 296 individuos que participaban en el *European Vertebral Osteoporosis Study* y concluyeron que algunas variantes genéticas de MGP podían predecir el riesgo de ambas patologías, aunque sólo en la población masculina. Crosier y cols.⁽¹³⁸⁾ hallaron una asociación significativa entre la calcificación arterial coronaria y ciertos polimorfismos de la MGP, solo en hombres.
- Osteoprotegerina (OPG): Se ha observado que ratones modificados genéticamente con expresión disminuida de OPG, desarrollan osteoporosis y



calcificación arterial⁽¹³⁹⁾, sugiriendo que los mecanismos de calcificación ósea y arterial puedan estar relacionados. Por otro lado, otros estudios han relacionado niveles elevados de OPG circulante con mayor presencia y severidad de enfermedad arterial periférica⁽¹⁴⁰⁾, y con mayor riesgo de mortalidad en aquellos pacientes con coronariopatía⁽¹⁴¹⁾. Esta paradoja podría explicarse si el aumento en suero de OPG representara un mecanismo compensatorio (ineficaz) para aplacar los mecanismos inmunes que conducen la calcificación arterial⁽¹⁴²⁾. Hay que destacar un estudio reciente⁽¹⁴³⁾, en el que se estudian 3 polimorfismos de OPG (163C, 245G y 209A) y su relación con fracturas vertebrales y calcificación aórtica. Tras un ajuste multivariable concluyeron que el genotipo 209AA mostró una fuerte asociación con una mayor incidencia de fracturas de alto grado al mismo tiempo que con una menor incidencia de calcificación arterial, reforzando las hipótesis de lo OPG como nexo de unión entre ambos procesos.

- Receptor de Quemocina 2 (CCR2): La MCP-1 es una citoquina que recluta monocitos y se encuentra en macrófagos, CMLs y células endoteliales. Está implicada en el proceso inflamatorio de la placa AE, y su acción esta mediada por el receptor transmembrana CCR2. El polimorfismo de este receptor conocido como variante Ile64 se asocia a una disminución de su actividad y se ha referido su posible efecto protector frente a calcificación coronaria determinada mediante TC⁽¹²³⁾.
- Fetúina-A: La fetúina-A (también llamada $\alpha 2$ -Heremans-Schmid glycoprotein -AHSG-) es un importante inhibidor de la calcificación sistémica, y se ha descrito su relación con la insuficiencia renal crónica (IRC). Los alelos AHSG1 y AHSG2 se

han vinculado a diferentes niveles de fetuina-A en suero. Un estudio en voluntarios sanos japoneses, estableció una asociación entre los diferentes alelos de AHSB y una disminución de fetuina-A junto a un aumento de los niveles de P libre⁽¹⁴⁴⁾. Algunos polimorfismos en la AHSB se han asociado con niveles aumentados en suero de fetuina-A relacionándolo con diferentes factores que afectarían a la calcificación arterial, como la diabetes tipo II, la obesidad y la dislipemia⁽¹⁴⁵⁾. En otro estudio se objetivó la asociación de 4 polimorfismos diferentes de la AHSB a la intensidad con la que se producía la calcificación de la placa coronaria en pacientes afectados de diabetes tipo II⁽¹⁴⁶⁾. Stenvinkel y cols.⁽¹⁴⁷⁾ en un trabajo realizado con pacientes afectados de IRC terminal encontraron que aquellos que presentaban el polimorfismo T256S de la AHSB tenían niveles más bajos de fetuina-A en comparación con los pacientes sin esta variante; la inflamación, además, tuvo un efecto inhibitorio sobre los niveles de fetuina-A en pacientes portadores del T256S. Por tanto, se ha hipotetizado que aquellos pacientes con IRC terminal y una propensión genética a tener niveles más bajos de fetuina-A, podrían tener un mayor riesgo de muerte prematura cardiovascular si, además, están sometidos a procesos de inflamación crónica.

- *Klotho (KL)*: Es una β -glucuronidasa con una amplia variedad de efectos entre los que se incluyen la regulación de la sensibilidad insulínica o de la producción endotelial de óxido nítrico (ON). Los niveles circulantes de KL disminuyen con el envejecimiento y con la insuficiencia renal. En ratones, defectos en la expresión del gen *kl* dan como resultado un síndrome similar al envejecimiento humano, incluyendo arteriosclerosis, osteoporosis, infertilidad, enfisema y calcificación



ectópica, asociado con un incremento en la producción de vitamina D⁽¹⁴⁸⁾. Una restricción dietética de la vit D inhibía el desarrollo de la enfermedad arterial y el envejecimiento prematuro de estos ratones. Estudios en humanos han identificado variantes funcionales de kl relacionadas con enfermedad coronaria, niveles de HDL, niveles de presión arterial sistólica, riesgo de accidente cerebrovascular y densidad ósea, pero no se encontró relación con la calcificación arterial.

- Receptor estrogénico: Los estrógenos y la osteoporosis han ido ligados históricamente con la calcificación en la arteriosclerosis⁽¹⁴⁹⁾. A pesar de ser desconocidas las vías estrogénicas potencialmente implicadas en la calcificación, Lehtimaki y cols.⁽¹⁵⁰⁾ estudiaron en 300 cadáveres la relación entre las variaciones del gen ESR1 y las características de las arterias coronarias. Observaron que la estría grasa, la fibrosis y los depósitos de calcio en la placa coronaria se relacionaban con los diferentes genotipos del ESR1 (receptores estrogénicos 1), observando que, en función del genotipo, los pacientes mayores de 53 años tenían un riesgo de hasta 10,6 veces de presentar trombosis coronaria. Así mismo, el genotipo del ESR1, y tras un ajuste adicional para la diabetes y la HTA, persistió cómo predictor independiente de lesiones coronarias complicadas y trombosis (p=0,007).
- Epóxido hidrolasa: esta enzima regula los niveles de ácido epoxieicosaédrico, el cual tiene múltiples funciones a nivel vascular (proliferación de CMLs, antiinflamatorio, vasodilatador y regulador de función plaquetar entre otros). Se han identificado 7 polimorfismos del gen que codifica a esta proteína. Cinco de ellos son silentes, pero el resultado de los otros dos es el cambio de una

arginina por glutamina en la proteína, quedando disminuida su actividad enzimática. Se ha visto que, en sujetos de raza negra, la presencia de al menos una copia de estos polimorfismos se asociaba con un riesgo dos veces superior de calcificación coronaria cuantificada mediante TC⁽¹⁵¹⁾.

- *Endonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1*: Se ha observado que mutaciones en su gen que disminuyen su actividad causan calcificación arterial “idiopática” infantil. Esta alteración genética se caracteriza por calcificación de la media, mineralización de las fibras elásticas y mioproliferación intimal, causando estenosis arterial⁽¹⁵²⁾.
- *Factor transcripcional intermediario 1 α (TIF1 α) y receptor detector del calcio (CASR)*: estudios en animales con mutaciones activadoras del CASR se han visto calcificaciones de arterias de mediano tamaño y arteriolas, así como un incremento a nivel renal de la expresión del receptor de la vitamina D. Por otro lado, defectos en la expresión genética del factor de transcripción intermediario 1 α (TIF1 α) desarrollan una distribución similar en la calcificación arterial. Así la vía TIF1 α , y CASR y VDR renal formarían el eje de regulación fisiológica en la supresión de la calcificación arterial⁽¹²³⁾.
- *Fibrilina 1(FBN1)*: parece ser esencial para la homeostasis de las fibras elásticas y para la adhesión de las células implicadas en la remodelación de la matriz extracelular arterial. Esto se apoya en estudios realizados en ratones con defectos en la expresión genética de la *Fbn1* que presentan una serie de anomalías predecibles: degeneración de las fibras elásticas, deposición excesiva de las proteínas de la matriz extracelular, elastolisis, hiperplasia intimal y calcificación. Las CMLs vasculares de ratones deficientes en fibrilina-1



muestran un repertorio sintético anormal de las proteínas de la matriz extracelular. Así tendremos una mayor degradación de la elastina, que a la vez se relaciona con el inicio de la calcificación de ésta; este proceso está mediado por MMPs concretamente la MMP-2 y la MMP-9⁽¹⁵³⁾. Mutaciones de la Fibrilina-1 dan lugar a las manifestaciones pleiotrópicas del síndrome de Marfan en los seres humanos, que se asocia con la hiperlaxitud articular, formación de aneurisma de la aorta y la calcificación, y al sobrecrecimiento de los huesos largos⁽¹⁵⁴⁾. No se han referido otras asociaciones de polimorfismos de FBN1 con otros fenotipos de calcificación arterial en humanos.

- MicroRNA: Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNA no codificantes, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional a través de la represión de la traducción del RNA mensajero (RNAm). Recientemente, se ha visto que una gran variedad de funciones de las CMLV involucradas en las distintas etapas de la progresión de la AE -diferenciación, migración, proliferación, síntesis de la matriz extracelular, apoptosis-, podrían ser reguladas por miRNAs. El miRNA-221 y miRNA-222 podrían actuar de manera sinérgica como promotores de la calcificación vascular a través de los cambios en la expresión de Enpp1 y Pit-1, sugiriendo que modulan la calcificación de las CMLV a través de las modificaciones en los niveles de fósforo y fosfatos inorgánicos⁽¹⁵⁵⁾. El miRNA-205 se ha relacionado con la regulación negativa de la β -glicerofosfato (β -GP), inductor de la diferenciación osteogénica de las células musculares lisas de aorta humana, mediado a través de la expresión del Runx2 y la Smad1⁽¹⁵⁶⁾. Por su parte, Cui y cols., observaron como la disminución del miRNA-204 contribuía a una inducción del β -GP con calcificación de las CMLV⁽¹⁵⁷⁾. Los

estudios anteriormente citados sugieren firmemente un sustrato genético en los procesos de aterogénesis y calcificación arterial. Sin embargo, cuestiones referentes a los mecanismos genéticos y moleculares de dicha asociación, frecuencia de los distintos polimorfismos en la población normal y su impacto fenotípico requerirán nuevos estudios.



Tabla 1.1

Proteínas del metabolismo óseo implicadas en la calcificación arterial y su gen correspondiente

Proteína codificada	Gen	Loci
Fosfatasa Alcalina	ALPL	1p36.1-p34
Proteína Gla ósea (osteocalcina)	BGP	1q25-q31
Sialoproteína II	BSP	4q21-q25
Receptor de calcitonina	CALCR	7q21.3
Anhidrasa carbónica II	CA2	8q22
Catepsina K	CTSK	1q21
Cordina	CHRD	3q27
Factor de unión al core α 1	Cbfa1	6p21
Factor de unión al core β	CBF β	16q22.1
klotho	KL	13q12
Proteína Gla de matriz	MGP	12p13.1-p12.3
Noggin	NOG	17q22
Osteonectina	ON	5q31.3-q32
Osteopontina	OPN	4q21-q25
Fosfatasa ácida resistente al tartrato	ACP5	19p13.3
Osterix	OSX	12q12
Proteína morfogénica de hueso 2	BMP-2	20p12
Proteína morfogénica de hueso 4	BMP-4	14q22-q23
Receptor de Proteína morfogénica de hueso IA	BMPR-IA	10q22.3
Receptor de Proteína morfogénica de hueso IB	BMPR-IB	4q22-q24
Receptor de Proteína morfogénica de hueso II	BMPR-II	2q33-q34
Factor estimulante de colonias 1	CSF1 (M-CSF)	1p21-p13
Receptor de factor estimulante de colonias 1	CSF1R (C-FMS)	5p33.2-33.3
Osteoprotegerina	OPG(TNFRSF11B)	8q24
Receptor activador de factor nuclear κ B	RANK	18q22.1
Ligando del receptor activador de factor nuclear κ B	RANKL	13q14
Factor de necrosis tumoral α	TNF	6p21.3
Receptor del factor de necrosis tumoral α	TNFR1	12p13.2
Receptor de TNF α asociado a factor 6	TRAF6	11p11.2
Interferon- β	INFB	9p21
Péptido relacionado a hormona paratifoidea	PTHrP	12p12.1-p11.2
Factor transformante de crecimiento β	TGFB1	19p13.1
Hormona paratiroidea	PTH	11p15.3-15.1
Leptina	LEP	7q31.3
Receptor de leptina	LEPR	1p31
Receptor 5 de lipoproteína de baja densidad	LRP5	11q13.4
Metaloproteinasa de matriz 3	MMP3	11q22.3
Enzima convertidora de angiotensina 1	ACE1	17q23
Enzima convertidora de angiotensina 2	ACE2	xp22

1.5. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CALCIFICACIÓN ARTERIAL

1.5.1 MÉTODOS DE IMAGEN

Para caracterizar las placas AE y objetivar las calcificaciones se han utilizado diferentes métodos de imagen, que han ido implementando sus posibilidades diagnósticas de la mano con los avances tecnológicos.

1.5.1.1 Radiología convencional

La radiografía simple se ha utilizado en estudios poblacionales para tratar de asociar la presencia de calcificaciones con la incidencia de patología cardiovascular. Iribarren y cols. analizaron en más de 100.000 sujetos sometidos a radiografía simple, la asociación de la presencia de calcificaciones en el arco aórtico, con la frecuencia de ingresos o mortalidad por patología coronaria, siendo el seguimiento medio de 28 años. A pesar de que la asociación fue significativa tras ajustar por otros factores de riesgo (RR=1,27, IC 95%: 1,11-1,45), la principal limitación de este estudio fue la escasa especificidad y sensibilidad de la radiografía simple para evaluar las calcificaciones. Si bien el elevado número de pacientes sugiere la posibilidad de que las calcificaciones vasculares puedan tener un valor en el pronóstico⁽¹⁵⁸⁾.

En el territorio carotídeo, se ha comprobado que, en las radiografías realizadas por problemas dentales (ortopantomografías), pueden apreciarse calcificaciones que se corresponden con el bulbo carotídeo (alrededor de la 3ª vértebra cervical) y se ha relacionado con patología AE carotídea y el desarrollo de ictus⁽¹⁵⁹⁾.

Así, la radiología convencional, no es un método de imagen válido para evaluar de manera adecuada las calcificaciones arteriales por múltiples motivos: no es un método cuantitativo, no es reproducible y no permite evaluar la progresión de las lesiones.



1.5.1.2 Ecografía

Las placas AE han sido caracterizadas mediante ecografía en relación a:

- La estenosis intraluminal que producen.
- Su composición histológica clasificándolas en ecolucentes (predominio de lípidos en su composición) o ecogénicas (mayor contenido fibroso y calcio)^(160, 161).
- Complicaciones en la placa: presencia de imágenes sugestivas de hemorragia intraplaca⁽¹⁶²⁾.

Por otra parte, diversos estudios de autopsias en pacientes con enfermedad coronaria sugieren que las placas ricas en lípidos son las que tienden a romperse y provocar clínica con mayor frecuencia (placas vulnerables)⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾, por lo que se ha tratado de asociar la ecogenicidad de la placa con la incidencia de accidentes cardiovasculares.

En el *Cardiovascular Health Study* se evaluó una cohorte de 5886 personas de más de 65 años, en las que se caracterizó la ecogenicidad de la placa carotídea mediante ecografía. Tras un seguimiento de más de 3 años, se encontró un riesgo relativo (RR) de AVC de 2,78 para las placas ecolucentes⁽¹⁶⁶⁾. También Mathiesen y cols.⁽¹⁶⁷⁾ estudiaron la asociación entre ecogenicidad de la placa y sintomatología en 223 sujetos con ECI (estenosis de carótida interna), encontrando un RR de 4,6 para las estenosis por placas ecolucentes tras ajustar por otros factores de riesgo, siendo esta diferencia significativa independientemente del grado de estenosis.

Otras características ultrasonográficas relacionadas con los fenómenos evolutivos de la placa, particularmente aquellas como neovascularización, ulceraciones y roturas, se han asociado con el desarrollo o riesgo de síntomas isquémicos cerebrales⁽¹⁶¹⁾. Por otro lado, no todas las placas rotas tienen rasgos histológicos de vulnerabilidad (el 20%

no tienen ninguno), y no todas las placas vulnerables por criterios histológicos evolucionan hacia la rotura⁽¹⁶⁸⁾.

Estos y otros estudios basados en el examen ecográfico de la placa AE han proporcionado información relevante sobre su composición, pero tienen la importante limitación de no ser objetivos, ya que basan sus resultados en datos cualitativos sin poder aportar una cuantificación de los componentes en la placa. Otro aspecto que afecta a la reproductibilidad de la técnica, además de lo anteriormente citado, sería la subjetividad aportada por ser una técnica operador dependiente⁽¹⁶⁹⁾. Además, técnicamente, la calcificación produce un artefacto en la exploración por la sombra acústica posterior que genera y lo convierte en uno de sus principales inconvenientes. Todas estas limitaciones hacen que la ecografía todavía no sea el método ideal para caracterizar la placa carotídea de una manera reproducible a pesar de su sencillez y su carácter no invasivo.

Más recientemente, la ecografía intravascular (IVUS) ha permitido la insonación directa de la placa AE sin interposición de estructuras tisulares salvo la sangre circulante. Estudios *in vitro* han demostrado su validez para identificar el calcio vascular intramural^(167, 170, 171).

Fujii y cols.⁽¹⁷²⁾ evaluaron 101 placas de AE coronarias en las que se detectó rotura mediante IVUS y 101 placas control con evidencia de integridad. Se evaluó el arco de calcio en las imágenes de sección transversal obtenidas cada 0,5 mm del segmento de mayor estenosis, teniendo en cuenta el número y la longitud de los depósitos de calcio. No hubo diferencias entre los dos grupos en cuanto al número de depósitos de calcio en la superficie. Sin embargo, la longitud del arco de calcificación en la superficie fue mayor en las placas control (95,8° vs 56,2°; $p < 0,001$). En cambio, el número de



depósitos de calcio en la base de la lesión fue significativamente mayor en las placas sintomáticas (OR: 1,8 vs 0,3; $p < 0,001$).

Wang y cols.⁽¹⁷³⁾ utilizaron el IVUS para evaluar la relación entre la calcificación de las lesiones arteriosclerosas coronarias, su presentación clínica y la severidad de la estenosis en una serie de 201 pacientes. Sus resultados mostraron que las lesiones responsables de la clínica de angina estable, infarto agudo de miocardio o angina inestable, tenían una carga de calcificación que iba progresivamente disminuyendo.

También, Beckman y cols.⁽¹⁷⁴⁾ observaron una mayor extensión de la calcificación en aquellos pacientes con lesiones asintomáticas, sugiriendo de nuevo el posible papel protector de la calcificación frente al desarrollo de accidentes isquémicos.

Sin embargo, el carácter invasivo de esta exploración y el calibre de las sondas (entre 3,2F y 4F) han limitado su utilización en el estudio de la ECI.

El desarrollo más reciente en la caracterización de la placa ha llegado con la utilización de la ecografía con contraste (EcoC). En esta técnica, se utilizaba, inicialmente, un agente intravenoso de microburbujas de aire estabilizadas por una matriz azucarada como la galactosa. Éstos, no difunden en tejidos circundantes, siendo toda la señal obtenida intravascular. Los contrastes de segunda generación ya no tienen aire dentro de las partículas sino un gas hidrofóbico. Actualmente el más utilizado contiene microburbujas de hexafluoruro de azufre estabilizadas por una fina y flexible capa de fosfolípidos, de un diámetro medio de 2,5 μm (entre 1 y 10 μm). Estos agentes, como hemos comentado, no difunden al espacio extravascular, lo que permite una evaluación precisa de la luz del vaso y de la neovascularización intraplaca, proceso presente en las placas hemorrágicas o con rotura. Así, la EcoC puede ser útil para identificar la ulceración de la placa a través de la neovascularización de la placa

carotídea⁽¹⁷⁵⁾. A pesar de estas ventajas, es una técnica altamente operador dependiente y propensa a una gran variabilidad interobservador. Además, existirían contraindicaciones relacionadas con el medio de contraste (ej. alergia, angina inestable, *shunts* derecha-izquierda)⁽¹⁷⁶⁾.

1.5.1.3 Resonancia Magnética (RM)

Dadas las limitaciones de la ecografía, y la necesidad de un método más objetivo para determinar la composición de la placa, han surgido numerosos estudios para evaluar la capacidad de la RM en este campo.

Desde un punto de vista técnico, existen múltiples protocolos para la obtención de imágenes que nos permitan discernir las diferentes partes de la placa carotídea. El *Fast spin echo* (FSE), es la técnica más usada, permitiendo obtener imágenes en secuencias T1, T2, *time of flight* (TOF), supresión de sangre (*black blood*) y secuencia ponderada en densidad de protones (PDW)⁽¹⁷⁷⁾.

La combinación de estas secuencias es útil a la hora de evaluar tejidos blandos ricos en agua y lípidos (hemorragia intraplaca o el *core* necrótico lipídico), pero resulta menos eficaz en la visualización de estructuras pobres en estas moléculas. Las calcificaciones (captadas como hipodensas -ausencia de señal-) son detectadas mediante RM con una gran sensibilidad y especificidad⁽¹⁷⁸⁾ aunque son difíciles de diferenciar de los tejidos adyacentes o de la luz arterial. La implementación de la RM, mediante la utilización de contrastes (Gadolinio, USPIO – *ultrasmall paramagnetic iron oxide*-) en el estudio de la placa, ha permitido mejorar la cuantificación de fenómenos inflamatorios y de neovascularización⁽¹⁷⁹⁾, pero no resultan útiles en la diferenciación del calcio, por su nula vascularización.



Limitaciones tales como la pulsatilidad arterial, y las escasas dimensiones de la región de interés, requieren la utilización de equipos de RM con elevada intensidad de campo magnético y prolongados tiempos de exploración. Estos inconvenientes, junto con la falta de protocolos estandarizados, hacen que, aunque algunos estudios propongan la RM para caracterizar la placa de manera cualitativa, en general, no se considere útil para la valoración cuantitativa del contenido de calcio.

No obstante, Saam y cols.⁽¹⁷⁷⁾ estudiaron mediante RM 40 pacientes sometidos a endarterectomía, y compararon las imágenes obtenidas con el examen histológico de las muestras quirúrgicas. El análisis de los resultados demostró que el porcentaje de calcificación de la placa era infraestimado con RM respecto a los datos histológicos (5% por RM vs 9,4%); a pesar de que no se encontraron diferencias entre ambos métodos al comparar el área calcificada ($2,7\text{mm}^2$ vs. $3,5\text{mm}^2$; $p=0,1$). Además, en este estudio, la RM demostró una sensibilidad de 84% y especificidad de 91% para caracterizar los componentes de la placa $>2\text{mm}^2$, pero ambas disminuían para estructuras de menor tamaño. Puppini y cols.⁽¹⁷⁸⁾ encontraron una sensibilidad similar y una especificidad mayor (94%) en su análisis *ex vivo* de 19 piezas de endarterectomía.

En el futuro, los estudios de imagen de la arteria carótida mediante RM deberían beneficiarse del uso de protocolos histológicos y de imagen predefinidos y validados para hacer más fiable la interpretación clínica. Además, la aplicación de la RM de 3,0 T e incluso 7,0 T, permitirá avances en la identificación *in vivo* de las placas vulnerables⁽¹⁸⁰⁾.

1.5.1.4 Tomografía computarizada (TC)

La angiografía con tomografía computarizada (AngioTC) ha demostrado su precisión en la estimación del grado de ECI⁽¹⁸¹⁾. Recientemente, se ha analizado su potencial utilidad en el análisis de la composición de la placa AE⁽¹⁸²⁾ destacando su capacidad para identificar con precisión la presencia de Ca en la pared arterial⁽¹⁸³⁾.

Su medición es posible con dos tecnologías similares en su fundamento, pero con diferencias de procedimiento sustanciales.

- *TC con multidetector (MDCT):* Se basa en la emisión de rayos X de forma rotacional alrededor del paciente. La adquisición de las imágenes, con una resolución espacial submilimétrica (determinada por el grosor de los detectores), puede realizarse de forma secuencial (mediante cortes transversales sucesivos y solapados) o espiral (adquisición volumétrica continua). La alta resolución de la MDCT permite identificar ulceraciones de la placa de hasta 1mm⁽¹⁸⁴⁾. La MDCT es un método no invasivo, rápido (tiempo en sala de aproximadamente cinco minutos y para tecnologías de ≥ 64 coronas, el tiempo de adquisición es de uno a cinco segundos), en donde las imágenes son generadas sin la interferencia o sobreposición de estructuras adyacentes. Además, los *voxel* son prácticamente isotrópicos, lo cual permite una evaluación multiplanar sin distorsión de las imágenes. La resolución temporal, principalmente determinada por el tiempo de rotación y los algoritmos de reconstrucción, también ha mejorado. El tiempo de rotación ha disminuido de los 750 mseg en los tomógrafos de 1D hasta los 280 mseg en los de 320 detectores⁽¹⁸⁵⁾. En resumen, la mayor velocidad de giro del tubo de rayos X, el menor tamaño de los detectores y el incremento en su número, permiten una



sustancial mejoría de la resolución temporal, resolución espacial y reducción de los tiempos de adquisición respectivamente.

- *CT de doble fuente (DSCT)*: Utiliza 2 fuentes de rayos X, con dos energías de emisión distintas. Así se consiguen diferentes densidades en el mismo tejido. Esto permite una mejor diferenciación tisular aplicando técnicas avanzadas de postproceso de la imagen. La DSCT tiene una alta resolución espacial y temporal, que, al combinarse con algoritmos de eliminación ósea, ofrecen una mejor visualización vascular. Entre las ventajas de la DSCT respecto a la MDCT estándar se incluye la capacidad de diferenciar la placa calcificada del contraste yodado, permitiendo así, una evaluación precisa del volumen de la placa calcificada y una fácil sustracción ósea⁽¹⁷⁶⁾.

La eficacia del TC en la identificación de calcificaciones coronarias ha sido comparada con la de la ecografía convencional⁽¹⁸⁶⁾, IVUS⁽¹⁸⁷⁾ y angiografía⁽¹⁸⁸⁾. Los resultados de estos estudios sugieren que la AngioTC es, probablemente, el método más preciso y reproducible para la detección no invasiva del calcio mural.

Denzel y cols.⁽¹⁸⁹⁾ evaluaron las piezas de endarterectomía de 92 pacientes con ECI >70% mediante TC, cuantificando el índice de calcificación según el método descrito por Agatston y mediante la medición radiológica directa de los cortes histológicos. La comparación de los resultados demostró la concordancia entre el índice de calcio y el grado histológico de calcificación mediante Rx, así como entre el índice de calcificación y la masa equivalente en mg de hidroxapatita ($r=0,969$, $p<0,001$).

Las imágenes obtenidas mediante TC caracterizan los tejidos en función de su coeficiente de atenuación radiológica, o número TC. Este coeficiente se mide en Unidades Hounsfield (UH), en honor a su descubridor Godfrey N. Hounsfield, premio

Nobel de Medicina en 1979 por el desarrollo de la tomografía computarizada. Los valores de estas unidades van desde -1000 (aire, zonas hipodensas) hasta +1000 (hueso compacto, contraste, cuerpos extraños, imágenes hiperdensas), asignando el valor 0 HU al agua. El tejido calcificado se traduce en imágenes hiperintensas, habitualmente por encima de 130 UH. No obstante, su medición exacta requiere la calibración previa de cada TC mediante *phantoms*, o simuladores tisulares que consisten en tubos con concentraciones conocidas de hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{OH}]_2[\text{PO}_4]_6$ densidad=3,153 gr/cm³) que se utilizan para determinar sus correspondientes valores de atenuación, estableciendo su relación a través de una ecuación de regresión lineal. Esta ecuación de calibrado se utiliza en cada protocolo de TC para normalizar los cálculos de la masa de calcio derivados de las muestras arteriales evaluadas^(4, 190). Para la cuantificación del contenido de Ca con AngioTC se han propuesto diversos índices:

Índice de Agatston (AS): Calculado a partir del coeficiente de atenuación máxima (TC^{máx}, medido en unidades Hounsfield, UH) de la región de interés (ROI) delimitada a partir del umbral de detección de calcio (habitualmente 130 UH) y su área: $AS = \Sigma(w \times A)$ (donde A es el área de la ROI y w es el coeficiente de atenuación compensado según su TC^{máx}: (w=1 si 130 UH < TC^{máx} < 200UH; w=2 si 200 UH < TC^{máx} < 300UH; w=3 si 300 UH < TC^{máx} < 400UH y 4 ≥ 400)⁽¹⁹¹⁾.

Índice de Agatston modificado (ASm): Se calcula mediante el producto del volumen de la lesión por la atenuación media de ésta (TC^{medio}): $ASm = TC^{\text{medio}} \times V$ (donde V es el volumen de la calcificación, calculado multiplicando el número de *voxels* que superan el umbral establecido por el volumen de cada *voxel*).

Masa de Ca: Se utiliza un *phantom* con densidades conocidas de hidroxapatita para determinar su nivel de atenuación en UH según el protocolo de TC aplicado. Así,



podemos establecer un modelo de regresión lineal que permite extrapolar directamente del TC^{medio} su correspondiente densidad de hidroxiapatita. Conociendo el volumen total de la calcificación, es posible determinar su contenido de Ca en valor absoluto⁽¹⁹²⁾: $\text{masa Ca} = d \times TC^{\text{medio}} \times V$, donde d es el factor de corrección que relaciona la densidad de Ca mineral del *phantom* y su TC^{medio} (densidad promedio en UH) y V es el volumen de la calcificación.

Hoffmann y cols.⁽¹⁹³⁾ en su estudio sobre 60 piezas de endarterectomía compararon los diferentes índices de calcificación (AS, ASm, volumen de calcio, masa Ca) con la cuantificación histológica (masa de hidroxiapatita residual tras incineración de la pieza histológica). La masa de calcio (hidroxiapatita) y el ASm son los índices más precisos, los más reproducibles y los que varían menos en función de la amplitud del corte de la TC.

Su utilidad para evaluar la relación entre el grado de calcificación arterial y la prevalencia o incidencia de accidentes isquémicos coronarios o neurológicos ha sido analizada en diversos estudios (Ver apartados 1.6.1 y 1.6.2).

1.5.1.5 Imagen Molecular

El principal método de imagen molecular utilizada para evaluar la placa carotídea es la tomografía por emisión de positrones (PET). Es una técnica de medicina nuclear, que utiliza elementos radiactivos que emiten positrones para obtener imágenes bi y tridimensionales de la distribución de moléculas radiactivas dentro del cuerpo humano. La tomografía por emisión de positrones está basada en la obtención de imágenes generadas a partir de la detección de los fotones liberados por los radionúclidos (p.e. ^{18}F -fluorodesoxiglucosa [FDG]). Al inyectar el radiofármaco, éste se

distribuye por todo el organismo, y se concentra donde el metabolismo celular está aumentado. En la exploración PET-TC, se realiza primero una TC de baja dosis para corregir atenuaciones y realizar una correcta localización anatómica. Después se realiza el *scanner* PET de emisión y finalmente se realiza una AngioTC diagnóstica. Posteriormente se realiza una fusión del PET y la AngioTC, localizando de forma precisa la actividad metabólica en estructuras anatómicas concretas.

La FDG se metaboliza parcialmente por glucólisis dentro de la placa de ateroma y es un excelente marcador de inflamación e hipoxia, por lo que se ha propuesto como marcador de actividad intraplaca⁽¹⁹⁴⁾.

Las imágenes obtenidas se reconstruyen en planos coronal, transversal y sagital. En la caracterización de la placa mediante PET-TC, hay que tener en cuenta ciertos aspectos diferenciales con respecto a otro tipo de estudios con esta técnica. Así, en los estudios oncológicos, las imágenes generalmente se obtienen a la hora de la inyección de la FGD. Sin embargo, esta imagen temprana, puede tener una baja resolución en los estudios de la actividad inflamatoria de la placa; en fases más tardías, al disminuir la actividad sanguínea, mejora la resolución del contraste. Blomberg y cols.⁽¹⁹⁵⁾ realizaron un estudio prospectivo sobre 40 pacientes, en el que cuantificaron la inflamación de la placa ateromatosa en el territorio carotídeo y en la aorta torácica mediante PET-TC. Objetivaron que la obtención de las imágenes a los 180 minutos daba como resultado una cuantificación mejorada de la placa aterosclerótica, comparada con las imágenes obtenidas a los 90 minutos.

Además del FDG, se han aplicado otros marcadores moleculares para formación de imágenes de placa. El ¹⁸F-fluoruro de sodio (¹⁸F-FNa) es un trazador que se distribuye en las micro calcificaciones activas de la placa AE. Estos depósitos microscópicos de Ca



se han relacionado con la progresión, ruptura e inflamación de la placa⁽¹⁹⁶⁾. Joshi y cols.⁽¹⁹⁷⁾, observaron que el ¹⁸F-FNa PET-CT fue más fiable que ¹⁸F-FDG en la identificación de las placas coronarias vulnerables. Estos autores encontraron, en muestras de arteria carótida, que la captación de ¹⁸F-FNa se produjo en zonas de ruptura de la placa, y se relacionó con calcificación activa, infiltración macrofágica y necrosis.

La caracterización de la placa carotídea mediante PET-TC, es reproducible y como sugieren algunos estudios presenta una excelente relación inter e intraobservador (valores de correlación interclase >0,90)⁽¹⁹⁸⁾.

Desde un punto de vista clínico, el PET-TC, puede ser utilizado como marcador de vulnerabilidad de la placa, para identificar a los pacientes con mayor riesgo de presentar eventos neurológicos, al margen del grado de estenosis⁽¹⁹⁹⁾, pero no resulta útil para cuantificar el contenido de Ca.

1.5.2 DETERMINACIONES TISULARES

Los métodos diagnósticos de imagen requieren la comparación con un patrón de referencia para determinar su precisión.

Aunque pueden utilizarse simuladores *ex vivo* con dicho fin, lo más habitual y eficaz, consiste en enfrentar sus resultados con el análisis histológico de muestras tisulares, que permite la visualización directa de la calcificación y la cuantificación de la masa de calcio. En general, los métodos biológicos utilizados para identificar y cuantificar el contenido de Ca en la placa AE son los siguientes:

1.5.2.1 Histomorfometría

Los métodos histológicos convencionales, son ampliamente utilizados para analizar la estructura de los tejidos. Sin embargo, el examen de muestras tisulares calcificadas añade algunas dificultades y requiere ciertas precauciones en su procesamiento.

Las piezas obtenidas de la endarterectomía pueden ser fijadas y teñidas con varios compuestos para ser observadas por microscopía óptica, la cual permite identificar los diferentes componentes de la placa. No obstante, la sección transversal de tejidos calcificados incluidos en parafina puede ser difícil, y la congelación de la muestra puede hacerlo todavía más difícil, requiriendo al menos su tratamiento previo con ácido nítrico o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Este procesamiento causa decalcificación parcial de la muestra y pueden reducir la inmunoreactividad de las proteínas ligadoras de calcio. Actualmente se utiliza la fijación de la pieza en formalina al 10% o formaldehído, seguida de inmersión en un bloque de parafina, que permite realizar cortes de grosor adecuado (suelen ser de 4 a 10 μm). La incrustación de tejido en plástico ayuda a prevenir la pérdida de calcificación durante la sección, manteniendo la tinción y la reactividad de los anticuerpos.

Para evaluar la composición de la pieza se utilizan diferentes tinciones (hematoxilina y eosina [H&E], tricrómico de Masson, van Gieson), pero la identificación del calcio requiere de una tinción específica, la tinción argéntica mediante la técnica de von Kossa. En esta técnica, los cortes de la muestra son tratados con una solución de nitrato de plata (Fig. 1.8).

La visualización de estas muestras tras la tinción, permite calcular el área o porcentaje de calcificación y otros componentes de la placa mediante técnicas de planimetría convencional⁽²⁰⁰⁾.

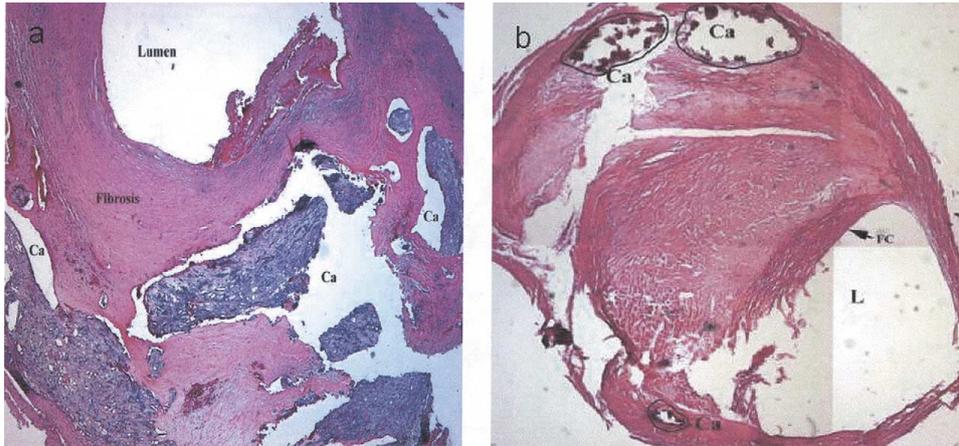


Figura 1.8 (a). Sección histopatológica de placa calcificada asintomática. (b). Cuantificación del calcio en cada sección (tinción H&E; magnificación original x40). L: lumen; Ca: calcificación; FC: cápsula fibrosa. Tomado de Shaalan y cols. J Vasc Surg. 2004⁽⁴⁾.

1.5.2.2 Cálculo de la masa de calcio

La masa de calcio puede estimarse a partir del peso de las cenizas residuales tras la incineración de la muestra correspondiente. La incineración se lleva a cabo en una mufla programable para el ascenso progresivo o fraccionado de la temperatura (700° C durante 48-72 horas).

El componente orgánico se volatiliza por combustión durante la incineración. Estudios previos demuestran que la masa de las cenizas residuales tras incineración de muestras de placa carotídea correspondían en un 99% a hidroxapatita⁽²⁰¹⁾. A partir de la masa, y conociendo la densidad de la hidroxapatita (3,153g/cm³), es posible calcular el volumen de la calcificación correspondiente.

Este método puede validarse sometiendo cantidades conocidas de fosfato β -tricalcico ($\text{Ca}_3\text{O}_5\text{P}_2$) a las mismas condiciones de incineración obteniendo un factor de corrección para la normalización de las mediciones⁽⁴⁾.

1.5.2.3 Espectrofotometría

La espectrofotometría infrarroja (FTIR, *Fourier Transform Infrared*) es un método analítico para identificar sustancias orgánicas, y permite caracterizar las vibraciones moleculares midiendo la absorción de radiación infrarroja. Debido a que cada componente de la muestra tiene unas características bioquímicas diferentes, obtendremos como respuesta a la irradiación con luz láser infrarroja (80 a 100 mW, $\lambda \sim 847\text{nm}$), diferentes espectros de emisión para cada componente. El análisis de estos espectros nos permitirá un análisis cualitativo de la placa que se corresponde adecuadamente con el examen histológico de la misma⁽²⁰²⁾.

El ATR (*Attenuated Total Reflectance*) es la técnica que estudia estos espectros de emisión y diferencia los componentes para caracterizar la placa. Estudios previos han demostrado la capacidad de esta técnica para caracterizar la placa de AE, identificando correctamente el componente lipídico, fibroso y las calcificaciones⁽²⁰³⁾ y su correlación con el estudio histológico de la muestra. La espectrofotometría tiene como ventaja, sobre las determinaciones histológicas, la poca preparación que requiere la muestra, ya que no precisa descalcificación del tejido para su posterior procesamiento y corte. Esto hace que sea un instrumento útil para la cuantificación del contenido de calcio.

Por otro lado, a pesar de que la espectrofotometría ha demostrado ser un método válido para la cuantificación de los componentes de la placa *ex vivo*, no resulta tan útil en la cualificación de los tejidos, por lo que se ha especulado la posibilidad de combinar este método con otro mínimamente invasivo como sería la RM.



1.5.2.4 Espectroscopia por RM con ^{31}P

La espectroscopia por RM con ^{31}P (^{31}P MRS), es una técnica basada en el fenómeno de resonancia magnética nuclear, y que permite valorar la composición química de los tejidos en función de sus espectros RM característicos. Se basa en la propiedad que presentan ciertos núcleos atómicos para absorber selectivamente la energía de radiofrecuencia cuando se someten a un campo magnético. Este exceso energético es liberado por los núcleos durante la fase de relajación nuclear. Así, el contenido mineral del hueso se puede cuantificar usando ^{31}P MRS porque el P del fosfato de la hidroxiapatita es distinguible del P de los metabolitos fosforilados disueltos en el citosol y de los fosfolípidos de las membranas⁽²⁰⁰⁾. Por consiguiente, el ^{31}P MRS puede ser utilizado para la cuantificación rápida de la hidroxiapatita en las placas AE. La intensidad de la señal del ^{31}P del fosfato integrado en la placa puede calibrarse utilizando como compuestos de referencia la hidroxiapatita sintética o hueso pulverizado. Esta técnica tiene como inconveniente el que es necesaria una eliminación de los lípidos de la placa, dejando el tejido en un estado no nativo. La ^{31}P MRS está generalmente restringida a muestras *ex vivo* con volumen inferior a $<1\text{ cm}^3$.

1.5.2.5 Micro TC (μTC)

Otra técnica utilizada para la cuantificación de Ca *ex vivo* es la μTC . Se trata de un sistema de microscopía de barrido basado en los principios básicos de la tomografía axial computarizada: reconstrucción de imágenes a partir de la determinación de la distribución de los coeficientes de absorción de Rx de cortes tisulares sin necesidad de alterar el tejido. Esta técnica nos permite calcular volúmenes, analizar la densidad y porosidad de un material, y realizar su representación tridimensional. La resolución

espacial por este método es de 20 μ m. La calibración de la μ TC se realiza mediante el escaneado de cantidades conocidas de hidroxapatita hidratada en una placa de microvaloración de 96 pocillos, esto permite la construcción de una curva de calibración estándar que puede usarse para el cálculo de muestras desconocidas. En el estudio de la calcificación de la pared arterial, la μ TC, permite la visualización y la localización de la hidroxapatita en muestras histológicas de pared arterial con dos distribuciones morfológicas características: nódulos de calcificación localizados principalmente en el núcleo necrótico de la placa AE o superficie luminal y placas de calcificación de la capa medial, extendiéndose a menudo alrededor de un segmento sustancial de su circunferencia⁽²⁰⁴⁾.

1.5.2.5 Microscopía electrónica de barrido

Las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) son capaces de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Las imágenes que se obtienen en el MEB corresponden a electrones secundarios o electrones retrodispersados emitidos tras la interacción con la muestra de un haz incidente de entre 5 y 30 KeV.

El haz de electrones se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y de tal modo que la posición en la que se encuentra el haz en cada momento coincide con la aparición de brillo, proporcionalmente a la señal emitida, en un determinado punto de la pantalla.

La señal de electrones secundarios se forma en una delgada capa superficial, del orden de 50 a 100 Å. Son electrones de baja energía, menos de 50 eV, que pueden ser desviados fácilmente de su trayectoria emergente inicial y permiten obtener



información de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad otorga a esta señal la posibilidad de aportar información “en relieve” (Fig. 1.9).

La emisión de electrones retrodispersados depende fuertemente del número atómico de la muestra. Esto implica que dos partes de la muestra que tengan distinta composición se revelan con intensidad distinta, aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas.

Los rayos X que se generan en una muestra sometida a bombardeo electrónico permiten identificar los elementos presentes y establecer su concentración

La preparación de las muestras requiere que estas sean conductoras, para ello se pulverizan las muestras con oro, carbono o aluminio.

Estos métodos, han sido adaptados al estudio de las arterias calcificadas *ex vivo*, permitiendo la visualización de patricular de la muestra de dimensiones del orden de nanómetros (10^{-9} m) y con ello una caracterización precisa del tejido, pudiendo diferenciar, por ejemplo, la placa calcificada del hueso, pues a pesar de las similitudes obvias, tanto en la química como en la cristalografía, existen claras diferencias entre el tejido vascular calcificado y el hueso: por un lado, el crecimiento altamente orientado en el hueso revela un carácter mesocristalino (cristales uniformes de tamaño intermedio), en oposición al carácter anisotrópico (cristalografía abigarrada e irregular) de la placa calcificadas y por otro lado, el tamaño molecular constitutivo de las placas calcificadas vasculares es muy inferior (rango nanométrico) al del hueso⁽²⁰⁵⁾.

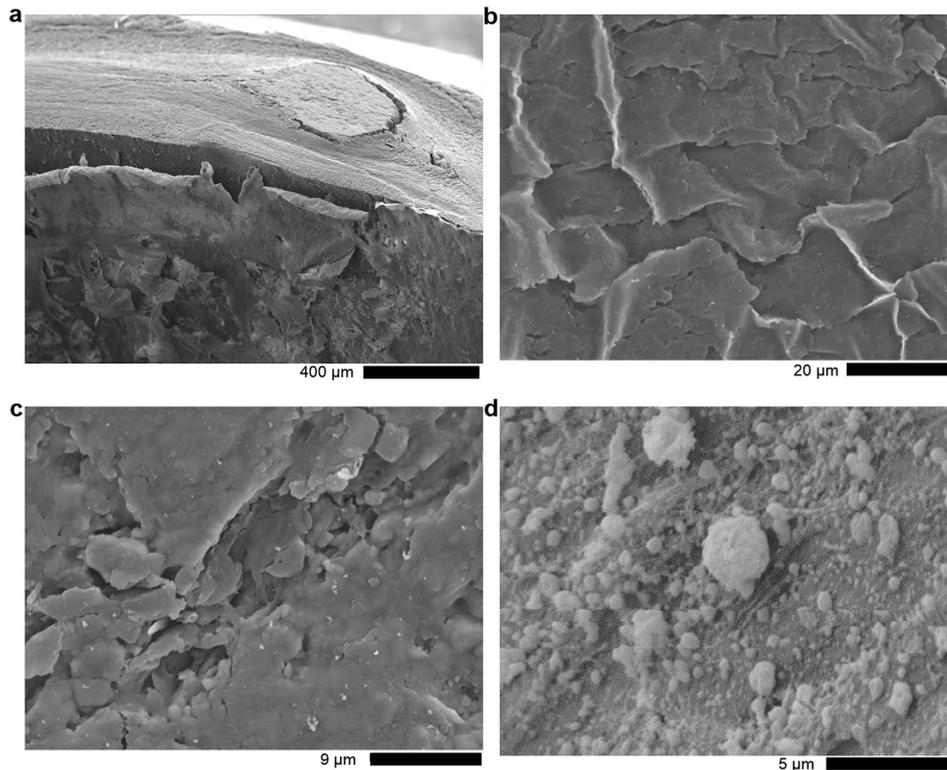


Figura 1.9 Micrografía por MEB de placa calcificada de tejido aórtico. Visión general **(a)**. Pared interior cubierta por placa fina **(b)**. Mayor magnificación de la placa calcificada **(c)**. Conglomerado de partículas esféricas densas de diferentes tamaños en la pared interna de la arteria **(d)**. Curtze y cols. Sci Rep. 2016⁽²⁰⁵⁾.

1.6 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA CALCIFICACIÓN ARTERIAL

La calcificación arterial es importante por su influencia en la sintomatología de la patología AE. Su relación con la clínica ha sido estudiada en diferentes territorios vasculares, encontrando datos contradictorios en algunos casos.

1.6.1 CALCIFICACIÓN CORONARIA

No está claro si la calcificación coronaria predice la inestabilidad de la placa o es simplemente un marcador de la carga de la placa. Los estudios con IVUS han revelado



que las placas muy calcificadas son más resistentes a la progresión del volumen de ateroma, comparado con aquellas placas menos calcificadas⁽²⁰⁶⁾. Por otro lado, se ha visto que la presencia de calcificación irregular comparada con su ausencia, se asocia con una mayor progresión del volumen de la placa de ateroma en pacientes con enfermedad coronaria estable⁽²⁰⁷⁾. Estudios biomecánicos, realizados sobre placas coronarias obtenidas de autopsias humanas, demostraron que la calcificación no aumentaba el estrés en la capa fibrosa de las placas coronarias, al contrario que los depósitos de lípidos, que aumentaban dramáticamente las tensiones en la superficie de la placa. Por otra parte, estudios de imagen mediante AngioTC en pacientes con síndromes coronarios agudos, así como las observaciones en autopsias de fallecidos por muerte coronaria súbita, han demostrado menos calcificación en placas rotas o vulnerables, en comparación con las placas estables^(208, 209). Todos estos hallazgos apoyan la idea de que el calcio confiere estabilidad mecánica a la placa. Sin embargo, la ubicación de la calcificación, parece ser primordial. Vengrenyuk y cols.⁽²¹⁰⁾, en un estudio realizado mediante técnicas de imagen de alta resolución *in vitro* (μ TC y microscopía confocal con tinción específica para el Ca) sobre placas procedentes de autopsias, describieron como las microcalcificaciones (típicamente de 10 μ m de diámetro) localizadas en el interior de la capa fibrosa de la placa, facilitarían su rotura por un aumento del estrés local. Sin embargo, en un estudio posterior, Kelly-Arnold y cols.⁽²¹¹⁾, demostraron como microcalcificaciones >5 μ m de diámetro podían predecir la rotura de la placa AE, mientras que las que presentaban un diámetro <5 μ m, aparentemente eran menos dañinas.

La posibilidad de medir de forma no invasiva con AngioTC los depósitos de calcio de la pared arterial, ha favorecido la inclusión de este parámetro en las ecuaciones de

predicción de riesgo coronario. El desarrollo de un software basado en este planteamiento ha experimentado cierto auge durante los últimos años, dada la importancia de un índice de calcificación con valor pronóstico⁽²¹²⁾.

Kondos y cols.⁽²¹³⁾, en su serie de 5635 pacientes asintomáticos encontraron, tras un periodo de seguimiento de 37 meses, que aquellos pacientes que tenían lesiones calcificadas avanzadas (cuartil superior) presentaban un riesgo dos veces superior de padecer accidentes isquémicos coronarios. En efecto, un incremento paradójico del riesgo coronario proporcional a la intensidad de la calcificación se apoya en éste y otros estudios que sugieren un riesgo 4,2 veces superior en aquellos pacientes con un AS entre 100 y 400⁽²¹⁴⁾. Estos resultados están aparentemente en desacuerdo con el efecto protector de la calcificación encontrado en otros estudios, citados con anterioridad, basados en el examen histológico de muestras de placa AE mediante técnicas de imagen de pacientes sintomáticos y asintomáticos (ver apartado 1.5.1).

Esta discrepancia podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que la calcificación coronaria es un predictor de riesgo genérico de eventos agudos, pero no es útil para identificar lesiones vulnerables.

La edad de presentación del evento coronario puede tener la clave en el papel predictivo de la calcificación, pues parece existir una relación inversa entre la calcificación, la estabilidad de la placa y la edad. Otsuka y cols.⁽²⁰⁸⁾, describieron como los pacientes que presentaban en la cuarta década de la vida placas con lesiones de rotura o placas vulnerables, éstas mostraban mayor calcificación que los que presentaban placas estables. Los autores no observaron diferencias en la calcificación de las placas en la franja de los 50-60 años. Por el contrario, se observó una



calcificación significativamente mayor en la década de los 70, tanto en las placas estables como en las inestables.

Por otra parte, el índice de calcificación coronaria podría aportar un aumento del valor predictivo sobre los modelos multivariantes tradicionales como los derivados de la ecuación de Framingham, ampliamente utilizada en la estimación de riesgo para eventos coronarios adversos. La desventaja de este método es que se trata de una herramienta de cribado basada en estudios poblacionales, mientras que el índice de calcificación mediante AngioTC proporciona, a priori, un enfoque más específico del paciente. Hadamitzky y cols.⁽²¹⁵⁾, en un estudio longitudinal durante 18 meses, compararon, en 1256 pacientes, la puntuación de riesgo de Framingham con el valor de riesgo coronario mediante AngioTC. En los pacientes con afectación coronaria por estudio de imagen, la puntuación de riesgo de Framingham subestimó el número de eventos coronarios de manera significativa. Por el contrario, en aquellos pacientes en los que no se detectó en la imagen coronariopatía, se observaron menos eventos coronarios de los señalados por la escala de riesgo. Así, la calcificación coronaria, podría complementar las escalas de riesgo, identificando aquellos pacientes con mayor riesgo de presentar eventos coronarios.

1.6.2 CALCIFICACIÓN CAROTÍDEA Y PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL

La significación clínica de la calcificación carotídea no está tan clara como en las arterias coronarias. Algunos estudios sugieren que el grado de calcificación se asocia a un incremento del riesgo de padecer eventos neurológicos⁽²¹⁶⁾, mientras que otros confieren a la calcificación de la placa un papel estabilizador⁽²¹⁷⁾.

El papel protector de la presencia de calcio en la placa AE carotídea frente al desarrollo de sintomatología tromboembólica se basa en los hallazgos de estudios histopatológicos que demuestran un menor contenido de calcio en las piezas de endarterectomía de pacientes sintomáticos⁽²¹⁸⁾. Este hecho se ha visto posteriormente reforzado por el análisis subjetivo del grado de calcificación carotídea con eco-Doppler en series de pacientes sintomáticos y asintomáticos, que han mostrado como las placas ecogénicas (calcificadas) se asocian con un menor riesgo de AVC independientemente del grado de estenosis⁽²¹⁹⁻²²¹⁾.

La limitación más importante de estos estudios es la heterogeneidad de clasificación de las placas, la mayoría de veces basada en aspectos cualitativos. La introducción de la TC como método objetivo de cuantificación del grado de calcificación, ha permitido la comparación de las placas y el seguimiento de su evolución *in vivo*.

Nandalur y cols.⁽²¹⁶⁾ analizaron las placas carotídeas de 31 pacientes con estenosis >60% mediante TC, y las clasificaron en no calcificadas, con calcificación intermedia y con calcificación severa según la densidad media en HU de las regiones de interés de los diferentes cortes realizados a 1,25mm. Al comparar esta clasificación con la sintomatología de manera retrospectiva, se encontró que en las placas calcificadas era 21 veces más probable la sintomatología (p=0,003). En un análisis posterior del mismo grupo en el que se evaluaba la calcificación de las placas en pacientes sintomáticos y asintomáticos se describió como aquellas placas con un volumen de calcio superior al 45% del volumen total de la placa, mostraban una fuerte tendencia hacia la estabilidad, definida por la falta de síntomas asociados⁽²²²⁾. Shaalan y cols.⁽⁴⁾ utilizaron también TC con cortes de 1,25mm de espesor con los que calcularon el área de



calcificación de cada corte, el área total de calcificación (suma del área calcificada de cada corte) y ratio de calcificación (área calcificada/área total), en 48 piezas de endarterectomía, encontrando que el porcentaje de área calcificada era el doble en las placas asintomáticas en comparación con las sintomáticas (48% vs 24% de calcificación, $p < 0,05$). Los hallazgos de este estudio a nivel histológico mostraron también que el infiltrado inflamatorio (carga de macrófagos) fue significativamente mayor en las placas sintomáticas (52% vs 23%, $p < 0,03$), encontrando una fuerte relación inversa entre grado de calcificación y de infiltrado inflamatorio ($r = -0,87$, $p < 0,001$).

Kwee y cols.⁽²²¹⁾, en una revisión sistemática, que incluyó 24 estudios, valoraron la asociación entre la calcificación carotídea y la sintomatología neurológica. Al analizar los estudios en conjunto, se obtuvo una OR de -0,425 (IC 95%, -0,608 a -0,241) para la asociación volumen de calcificación carotídea y sintomatología y una OR de -0,997 (IC 95%, -1,793 a -0,200) para el porcentaje de calcificación y sintomatología, lo que sugiere que esta determinación, el porcentaje de calcificación, podría ser un parámetro relevante para la estabilidad de la placa. Entre las limitaciones de este trabajo, tal como destacan los autores, está la gran heterogeneidad en los métodos de detección del Ca de la placa carotídea (AngioRM, AngioTC, eco-Doppler), y la ausencia de unos criterios unificados para definir los eventos neurológicos asociados a la placa carotídea.

Desde otra perspectiva, la determinación del contenido de calcio y su distribución en las lesiones carotídeas, podría entenderse como un estado de “blindaje” o protección de la placa frente a episodios tromboembólicos, lo que explicaría, al menos parcialmente, la menor prevalencia de sintomatología neurológica en las lesiones cuya

calcificación se localiza en la superficie o en los talones de la placa. Así, Miralles y cols.⁽⁵⁾ en un estudio prospectivo de casos y controles, en el que evaluaron 26 pacientes, 19 neurológicamente sintomáticos (casos) y 13 asintomáticos (controles), todos con estenosis carotídea >60%, observaron que los pacientes asintomáticos presentaban con más frecuencia la distribución del Ca en la superficie de la placa, respecto a los sintomáticos (9/12 vs 3/15 respectivamente, $p=0,006$). Por otro lado, aquellas placas no calcificadas o con una localización posterior de la calcificación presentaban 12 veces más riesgo de presentar síntomas (OR:12, 95% IC: 1,5- 91,1, $p=0,021$). La idea de la localización de la calcificación como factor crítico en la estabilidad de la placa ha sido apuntada también por otros autores⁽²²³⁾.

Es obvio que la histología es el *patrón oro* para obtener la composición de la placa, pero no debemos olvidar que la geometría del vaso y su repercusión sobre la hemodinámica determinará la evolución y progresión de la propia placa. Es por ello que, recientemente, se ha incorporado el análisis de parámetros biomecánicos al estudio de imagen de la placa *in-vivo*^(224, 225).

Sin embargo, el significado de los depósitos de calcio es todavía incierto, pudiendo ser interpretado como registro de procesos inflamatorios previos, como sugiere la co-localización de los depósitos iniciales de calcio con macrófagos y linfocitos T en el infiltrado inflamatorio de las placas inestables⁽²²⁶⁾. De hecho, la calcificación es el resultado de la degeneración y la necrosis tisular de muchas enfermedades inflamatorias crónicas. La precipitación de calcio en la pared arterial, responde al desarrollo de células tipo *osteoclasto* y *osteoblasto* cuya diferenciación se debe a la acción de diversas citoquinas inflamatorias, por lo que cabría pensar que la inflamación



es un paso previo a la calcificación, siendo las placas inflamatorias no calcificadas más susceptibles al riesgo de rotura y embolización⁽²²⁷⁾.

Se requieren nuevos estudios que se centren en los determinantes del papel de la calcificación dentro de la placa carotídea y las relaciones entre la carga de Ca y el riesgo de desarrollar sintomatología neurológica de origen tromboembólico.

1.6.3 CALCIFICACIÓN VASCULAR Y OSTEOPOROSIS

La calcificación de la capa media arterial es un fenómeno largamente conocido que se ha asociado al depósito pasivo de iones de calcio y fosfato, cuando su producto de solubilidad supera el umbral de saturación en los fluidos orgánicos. Este efecto se observa en determinadas condiciones patológicas como la diabetes, insuficiencia renal crónica, hiperparatiroidismo o hipervitaminosis D.

Por el contrario, la calcificación intimal es un proceso activo, íntimamente ligado a los mecanismos de aterogénesis, pero cuyo origen concreto sigue rodeado de un halo de misterio. Se ha relacionado con fenómenos de metaplasia ósea, alteración sistémica o local del metabolismo Ca/P, o como secuela de procesos inflamatorios previos.

Por otra parte, la osteoporosis o pérdida de masa ósea, se observa en un porcentaje importante de la población, especialmente en mujeres a partir de la menopausia. Se estima que, de los 50 años hasta los 60 años, la mujer, por su menopausia pierde desde un 10% hasta un 50% de su masa ósea.

La enfermedad cardiovascular y la osteoporosis (OP) se han considerado tradicionalmente relacionadas de forma intrínseca con el envejecimiento, subestimándose su posible asociación. Ambos procesos comparten factores de riesgo

comunes, como la dislipemia, la hipertensión, la diabetes, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la inactividad física y la menopausia, aparte del envejecimiento. Esto puede hacernos pensar que el metabolismo óseo y la calcificación vascular (CV) tengan mecanismos fisiopatológicos o incluso una etiología común⁽²⁴⁾. La existencia de un nexo común entre ambos fenómenos ha sido sugerido por algunos autores. Existen datos que sugieren que la pérdida ósea puede promover la calcificación vascular y a su vez, la baja densidad mineral ósea (DMO) se ha relacionado con el aumento de los eventos cardiovasculares. La calcificación vascular es el acontecimiento central en la relación entre la pérdida ósea y el riesgo cardiovascular, ya que se han observado mecanismos moleculares de formación ósea en las placas calcificadas⁽²²⁸⁾.

En el estudio Framingham, la mayor incidencia de coronariopatía se encontró entre mujeres con una mayor pérdida de masa ósea cortical en metacarpo a lo largo de un periodo de seguimiento de 30 años⁽²²⁹⁾. Contrariamente, en otro análisis de los datos aportados por este mismo estudio, sobre 2499 pacientes con calcificación vascular, no se observó, en el seguimiento a largo plazo, un incremento en el riesgo de fractura de cadera en este grupo, desafiando la idea de que la calcificación vascular pueda tener un impacto directo en la pérdida ósea⁽²³⁰⁾. Otros estudios, han relacionado la calcificación aórtica con la descalcificación medida en cuerpos vertebrales con radiología convencional y, más recientemente con TC^(231, 232). Así mismo, se ha sugerido una relación inversa entre la intensidad de calcificación coronaria (*calcium score*) y la medición densitométrica de calcio óseo⁽²³³⁾. Sin embargo, la relación causal entre la calcificación vascular y la osteoporosis no ha sido demostrada de forma concluyente. Román-García y cols.⁽²³⁴⁾ proponen una explicación a partir del hallazgo de una sobreexpresión de las *Secreted Frizzled Related Proteins* (SFRPs), proteínas inhibidoras



de la vía Wnt, en las áreas con calcificación vascular severa, probablemente en el intento de reducir la mineralización en la pared vascular. Sin embargo, como las SFRPs son proteínas circulantes, podrían actuar, no sólo localmente en los vasos, sino también sistémicamente, deteriorando la mineralización a nivel óseo y conduciendo a una reducción de la masa ósea.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

2.1.1 HIPÓTESIS CONCEPTUAL

Un mayor contenido de calcio de la placa arteriosclerosa contribuye a su estabilidad y le confiere una menor tendencia a la progresión, actuando como factor protector frente al desarrollo de fenómenos tromboembólicos.

2.1.2 HIPÓTESIS OPERATIVA

2.1.2.1 La reconstrucción volumétrica de la placa carotídea mediante AngioTC permite la estimación del contenido de Ca y la variación en el volumen de la placa AE.

2.1.2.2 Los pacientes con un menor contenido de calcio en la placa AE carotídea presentan una mayor progresión de ésta y, eventualmente, una mayor incidencia de fenómenos tromboembólicos.

2.1.2.3 Los pacientes con mayor progresión en la calcificación de la placa carotídea presentan mayor tendencia a la osteoporosis.

2.1.2.4 Este fenómeno podría explicarse por mecanismos genéticos y bioquímicos comunes.



2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVOS PRINCIPALES

2.2.1.1 Diseñar un método de medición de la ateromatosis carotídea y contenido cálcico basado en reconstrucciones volumétricas mediante AngioTC.

2.2.1.1 Analizar, mediante AngioTC, el grado de calcificación arterial y su relación con:

A. La progresión de la ateromatosis carotídea

B. Protección frente al desarrollo de episodios tromboembólicos.

2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

2.2.2.1 Evaluar la relación entre calcificación arterial carotídea y osteoporosis, así como su posible conexión a través de los factores humorales implicados en la regulación del metabolismo Ca-P.

2.2.2.2 Evaluar las relaciones entre los polimorfismos genéticos del gen de la OPG (*tnfsf11b*) y la progresión de la calcificación en la placa de ateroma.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 ESTUDIO PILOTO.

Cuantificación y caracterización del calcio carotídeo con AngioTC en pacientes neurológicamente sintomáticos y asintomáticos.

Antes de continuar con la descripción del estudio actual, es preciso describir brevemente el trabajo preliminar publicado por nuestro grupo sobre “cuantificación y caracterización del calcio carotídeo con AngioTC” en pacientes neurológicamente sintomáticos y asintomáticos⁽⁵⁾ en el que, con un planteamiento metodológico similar al que describiremos más adelante, se establecen las bases del desarrollo del presente trabajo.

Con un diseño de casos y controles, se incluyeron 32 pacientes consecutivos con estenosis >60% detectada mediante eco-Doppler. Diecinueve pacientes (casos) eran sintomáticos (AVC: 12; AIT: 2; síntomas oculares: 5) y 13 asintomáticos (controles).

Todos los pacientes fueron sometidos a AngioTC y reconstrucción 3D de las imágenes obtenidas (2 cm proximal y 1 cm distal a la bifurcación carotídea), que se utilizaron posteriormente para el análisis volumétrico.

Se determinó el contenido de Ca mediante el *Agatston Score* modificado (ASm) (volumen de calcificación (mm³) x densidad media de Ca (UH)).

La cuantificación de la masa de Ca se determinó a partir de las muestras de endarterectomía carotídea y su incineración posterior en 11 pacientes. El contenido de Ca se estimó a partir del peso de los restos (96% hidroxapatita).

Los resultados de este estudio aparecen desglosados y discutidos en los apartados siguientes.



3.2 ESTUDIO ACTUAL

Cuantificación del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante AngioTC: perfil evolutivo y relación con la progresión del grado de estenosis volumétrica

3.2.1 DISEÑO

Se trata de un estudio de cohorte prospectiva y medidas repetidas. En función de la estimación del tamaño de la muestra para el objetivo principal y los criterios de inclusión y exclusión considerados (ver apartados correspondientes), se incluyeron inicialmente 54 pacientes diagnosticados de ECI moderada (reducción del 50 al 70% de la luz arterial en eco-Doppler basal), neurológicamente asintomáticos y procedentes del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe* de Valencia.

El diseño del estudio abarcó la AngioTC y la densitometría ósea, basal y a los 12 meses, estudio bioquímico (incluyendo metabolismo Ca-P), y estudio genético (incluyendo el polimorfismo del gen candidato), según el protocolo, estructurado por objetivos, que aparece reflejado en la Fig. 3.1:

1. (objetivo 2.2.1.1). Medición volumétrica de la bifurcación carotídea. Concepto alternativo a la gradación de estenosis. (n=45).
2. (objetivo 2.2.1.2.A) Determinación del calcio intraplaca y su relación con la progresión de la ateromatosis carotídea. (n=45).
3. (objetivo 2.2.2.1). Calcificación arterial y descalcificación ósea. Relaciones entre ambos procesos. (n= 32).

4. (objetivo 2.2.2.2). Polimorfismo genético y progresión de la calcificación en la placa (n=48).

Este planteamiento se ajusta a los objetivos planteados en la sección anterior y se seguirá en adelante en la presentación y discusión de los resultados.

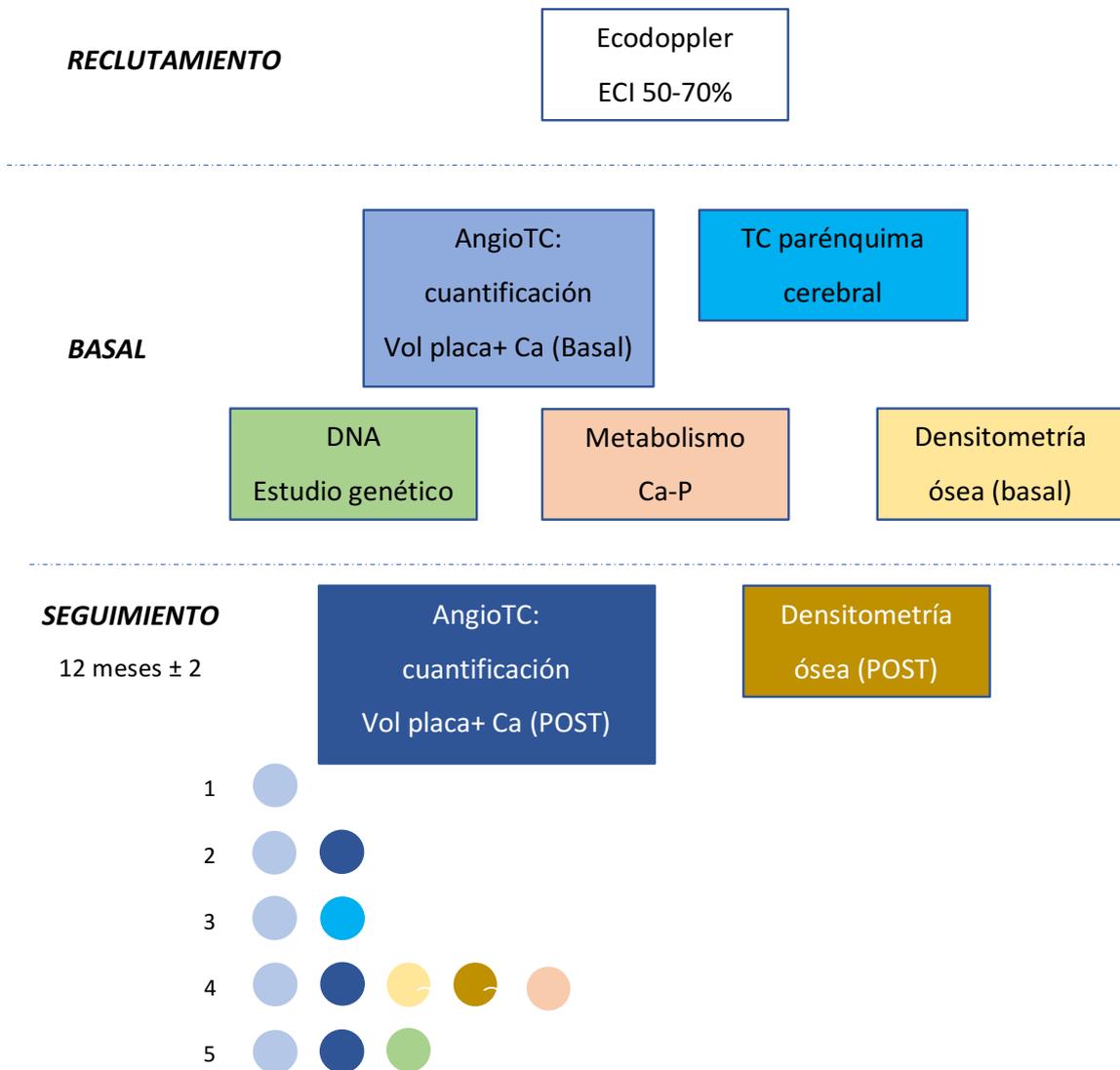


Figura 3.1 Protocolo de estudio estructurado por objetivos (ver descripción en el texto). 1: Medición volumétrica de la bifurcación carotídea. Concepto alternativo a la gradación de estenosis. 2: Determinación del calcio intraplaca y su relación con la progresión de la ateromatosis carotídea. 3: Papel protector frente al desarrollo de sintomatología neurológica tromboembólica (estudio piloto). 4: Calcificación arterial y descalcificación ósea. Relaciones entre ambos procesos. 5: Polimorfismo genético y progresión de la calcificación en la placa.

3.2.2 PACIENTES

3.2.2.1 Población muestral (ámbito)

Pacientes remitidos a la Consulta Externa del Servicio de Angiología y Cirugía Vascolar del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe* por patología aneurismática de la aorta abdominal o por isquemia de las extremidades y sometidos a cribaje de estenosis carotídea.

3.2.2.2 Población de estudio

Pacientes consecutivos diagnosticados de ECI moderada -estenosis comprendida entre el 50% y el 70% de la luz arterial-, neurológicamente asintomáticos y que cumplieran los criterios de inclusión.

3.2.2.3 Criterios de inclusión

1. Edad mayor de 18 y menor de 80 años, que es la definida por nuestro grupo como límite para la indicación de endarterectomía carotídea de forma protocolizada.
2. Ateromatosis carotídea en paciente *asintomático* que cumplan la condición:
3. ECI 50%-70% bilateral o unilateral
4. ECI < 70% contralateral

3.2.2.4 Criterios de exclusión

1. Cirugía carotídea previa
2. Sintomatología neurológica vértebro-basilar o inespecífica.
3. IRC, definida como valor de la creatinina plasmática >1,5 mg/dl puesto que podría representar una limitación para la administración de contraste intravascular.



4. ECI >70%. Estos registros se utilizaron como control interno para valorar la precisión de la AngioTC en la determinación de la masa de Ca en estudio piloto.

5. Ateromatosis carotídea en paciente *sintomático* de < 6 meses de evolución que cumplan la condición:

- ECI 50-70% bilateral o unilateral

- ECI < 70% contralateral y alguno de los siguientes hallazgos:

- Embolismo de art. central de la retina o sus ramas verificadas por exploración de fondo de ojo.

- AVC con infarto cerebral ipsilateral documentado en TC cerebral:

- Sintomatología neurológica inferior a 24 horas motora y/o sensorial contralateral y ausencia de lesiones en parénquima cerebral en TC cerebral.

3.2.3 CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Basándonos en un estudio piloto previo realizado por nuestro grupo sobre 32 pacientes diagnosticados de ECI>60% en el que se valoró el contenido de calcio mediante AngioTC, se estableció un riesgo alfa de 0,05, una potencia del 80% y una desviación estándar común de 98,55 UHxmm³. Asumiendo estos parámetros y una pérdida durante el seguimiento del 10% de pacientes, se estimó que serían necesarios 56 pacientes para identificar una diferencia en el volumen de Ca y/o placa AE del 10%. Por otro lado, para analizar la correlación entre la variación del volumen de la pared arterial y la variación del contenido de Ca, asumiendo una pérdida del 10% de los casos

durante el seguimiento, la correlación debería ser inferior a 0,4 para no hallarla estadísticamente significativa con la potencia y nivel de significación considerados.

3.2.4 VARIABLES Y DETERMINACIONES

3.2.4.1 Variables Dependientes

3.2.4.1.1 Estimación de la variación del volumen de la pared arterial. (Protocolos Eco-Doppler y AngioTC).

Cohorte (Progresión de placa AE): Variación de volumen de la pared arterial (medición a través de la diferencia de columna de contraste) entre la primera y la segunda exploración de AngioTC realizada con un intervalo de 12 ± 2 meses en todos los pacientes. Se procesó como variable continua dependiente en un modelo de regresión lineal múltiple (ver protocolo de AngioTC en apartado siguiente).

La selección inicial de pacientes con ECI >50% se realizó mediante eco-Doppler en el Laboratorio de Hemodinámica Vascular (LHV) del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Los exámenes se llevaron a cabo con un ecógrafo Phillips HDX11 (Phillips Healthcare, Andover, Mass) y sonda lineal según protocolo carotídeo estándar. Se utilizó un valor umbral de velocidad sistólica máxima >120 cm/s para clasificar la ECI >50% y un valor de velocidad sistólica máxima >200 cm/s para identificar la ECI >70%.

Para la estimación de los parámetros morfológicos de estenosis volumétrica y caracterización del Ca intraplaca, todos los pacientes fueron sometidos a una AngioTC del sector carotídeo mediante un protocolo estandarizado en el que se realizó una adquisición helicoidal de imágenes desde cayado aórtico hasta la base de cráneo. Las exploraciones tomográficas se realizaron utilizando un equipo *Siemens Somaton*



Sensation 64 Multidetector (Siemens AG, Forchheim, Germany), con el siguiente protocolo de adquisición: se obtuvieron secciones de 3 mm de espesor solapadas con un *pitch* de 1,5:1, utilizando un campo de 12 cm para generar imágenes segmentadas axiales de 1 mm de espesor. La tomografía se realizó en dirección caudocraneal. Se inyectaron 70 ml de iomeprol (400 mg/ml de yodo) en vena antero cubital a una velocidad de infusión de 3.5 ml/s, y después 40 ml de suero salino, utilizando un inyector automático *Stellan D CT inyector* (Medrad, Pittsburgh, EE.UU.) de cabeza dual. El momento de adquisición óptimo se determinó mediante la técnica de *bolus test*, situando el ROI en el arco aórtico con un umbral de disparo de 100UH.

Las imágenes fueron obtenidas en el plano axial y transferidas en formato DICOM al PACS del hospital para realizar el post-proceso en una estación de trabajo *Advantage Windows 4.2* (GE Healthcare, Milwaukee, Wis) y la realización de reconstrucciones multiplanares sagitales y coronales. Mediante protocolos de análisis de volumen se realizó la reconstrucción “semitransparente” 3D de la bifurcación carotídea. Se estimó el grado de ateromatosis carotídea a partir del volumen de contraste obtenido en la bifurcación carotídea (2 cm por debajo y 1 cm por encima por encima del punto en que se separan la ACI y la arteria carótida externa en el corte transversal -VBif-) (Fig. 3.1). Para estandarizar dicha medición y evitar el sesgo por variaciones en la densidad de contraste, se determinó el cociente entre Vbif y un segmento de carótida primitiva (VCP) de 1 cm libre de placa.

Este procedimiento nos permitió el estudio de las variables relacionadas con el cálculo del volumen de la placa en el segmento estudiado.

La variación de volumen de la pared arterial se determinó a partir de la variación del producto del volumen de la columna de contraste y su densidad radiológica en UH

(densitometría volumétrica) entre el estudio basal y el control tal como muestra la Fig. 3.2.

3.2.4.2 Variables independientes

3.2.4.2.1 Estimación del contenido y la distribución del calcio mineral. (Protocolo de AngioTC).

Al igual que el protocolo de medición volumétrica de la estenosis, se estimó el contenido de Ca a partir de las imágenes obtenidas en la bifurcación carotídea, 2 cm por debajo y 1 cm por encima por encima del punto en que se separan la ACI y la arteria carótida externa en el corte transversal (Fig. 3.1). Se determinó a partir del producto del volumen total de las calcificaciones en la reconstrucción 3D del sector explorado y su densidad radiológica promedio en UH, obteniendo así el denominado *Agatston score* modificado (ASm) (Fig. 3.3)⁽¹⁹¹⁾. Se evitó incluir las calcificaciones de la pared en contacto directo con la columna de contraste mediante su filtrado manual, estableciendo un umbral de densidad radiológica a partir de 450 UH. En todos los pacientes se realizó un AngioTC basal y otro a los 12 ± 2 meses para determinar la evolución de la calcificación y su relación con la evolución de la placa AE.

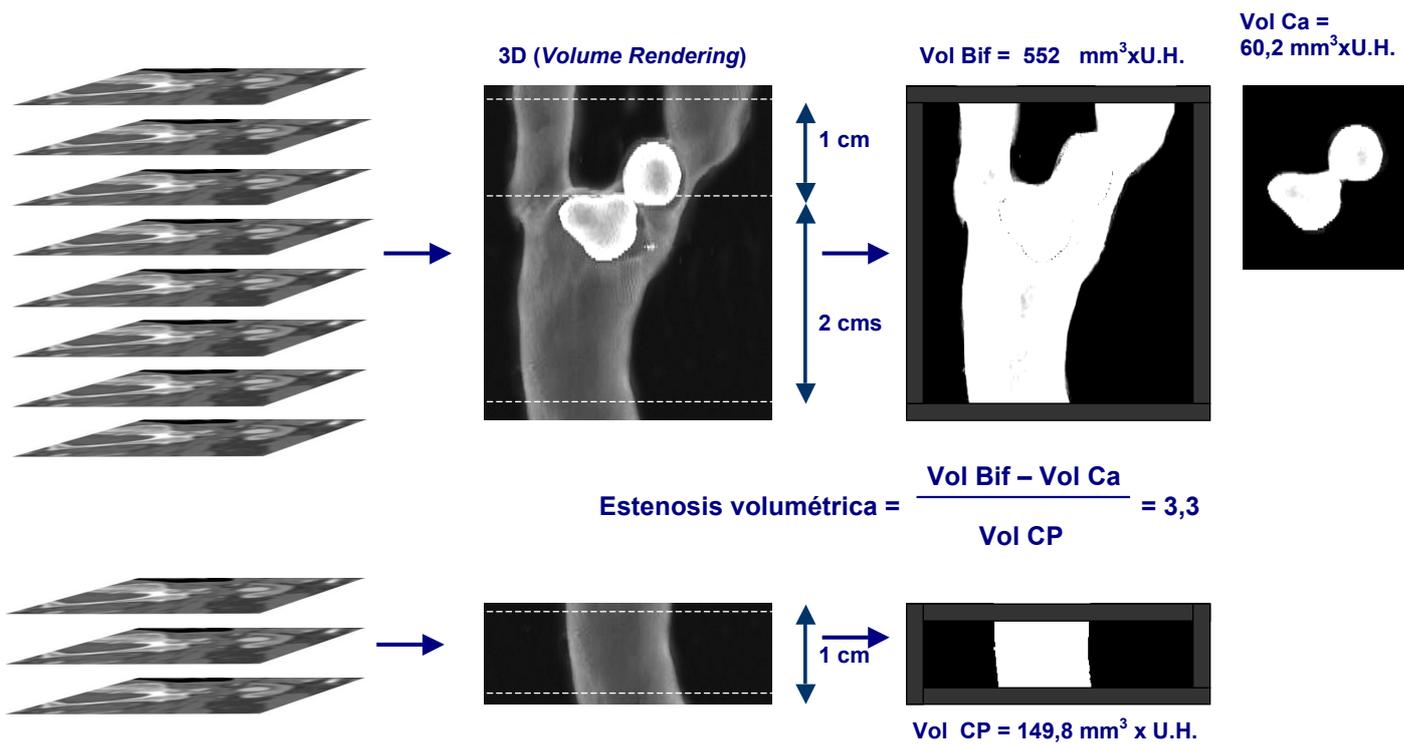


Figura 3.1 Medición volumétrica de la bifurcación carotídea con AngioTC 3D (Volume Rendering). Vol Bif = volumen bifurcación (mm³xUH); Vol Ca= volumen calcificación (mm³xUH); VP= volumen carótida primitiva proximal (mm³xUH).

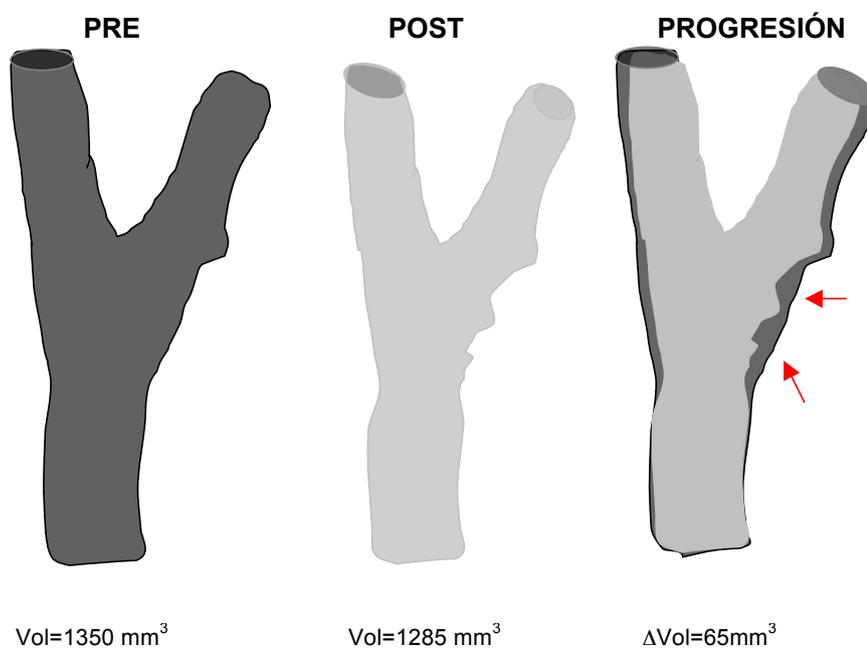
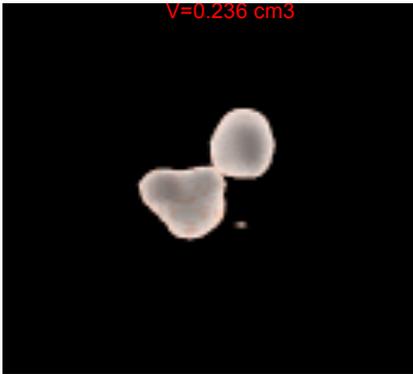
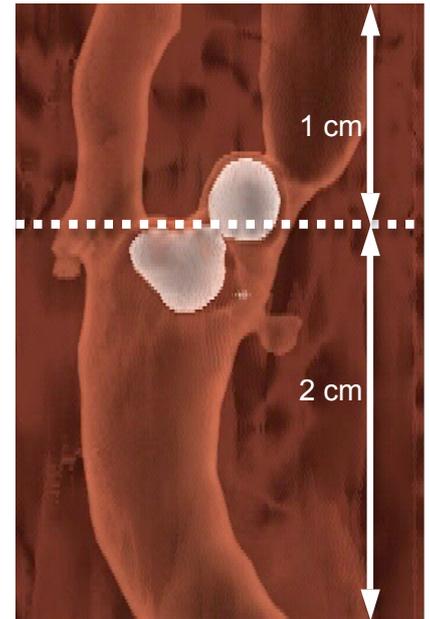
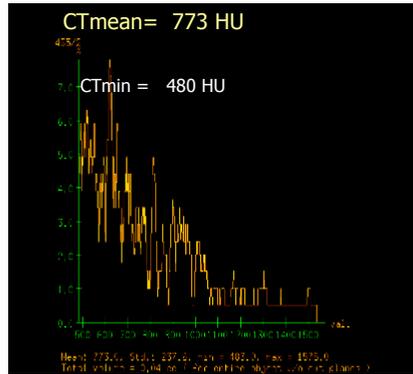


Figura 3.2 Progresión AE carotídea. Estimación a partir de la variación en el volumen de la columna de contraste en la bifurcación carotídea, estudio basal y a los 12 meses.

volumen



densidad/TC (UH)



$$AS = V \times TC^{\text{media}}$$

Densidad radiológica (UH)

Figura 3.3 Determinación del Agatston score modificado (ASm) a partir del volumen de Ca aislado de la placa en la AngioTC mediante la reconstrucción 3D.

3.2.4.2.2 Estimación de la variación de la densidad mineral ósea (DMO). (Protocolo densitometría ósea).

Se utilizó un protocolo estándar de absorciometría por rayos X de doble energía (DXA o densitometría ósea). Para ello se utilizó el modelo *General Electric Lunar Prodigy* (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA). Este equipo permite la medición directa de las imágenes y proporciona una cifra de la cantidad mineral ósea por superficie.

Se realizaron determinaciones de la densidad promedio mineral del hueso (DPH), que es el cociente entre el contenido mineral del hueso y el ancho de la línea escaneada, y se expresa en g/cm^2 . El DPH se calculó en la columna lumbar y la cabeza femoral en el momento de la inclusión en el estudio. Los resultados se expresaron en 2 medidas: el *T-score* que compara la DPH del paciente con el de una persona sana de 30



años del mismo sexo y etnia y el *Z-score* que indica el número de desviaciones estándar de un paciente con DPH diferente del promedio por edad, sexo y etnia. Resultados negativos indicarían una menor densidad ósea y positivos una mayor densidad. Todos los pacientes fueron sometidos al mismo protocolo a los 12±2 meses.

3.2.4.2.3 Análisis genético

El DNA de los pacientes se extrajo a partir de muestras de sangre periférica empleando protocolos estandarizados. A partir de 20 ng de DNA se estudió la incidencia de 7 SNPs del gen OPG mediante un ensayo con sondas TaqMan® siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Ca, USA). Las muestras se analizaron por duplicado en placas de 96 pocillos, la reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480® (Roche, USA) y la lectura se realizó mediante el software de genotipado en punto final (Endpoint Genotyping Software). Los polimorfismos estudiados fueron T245G, T950C, A163G, T149C y G209A (nomenclatura NCBI: rs3134069, rs2073617, rs3102735, rs3134071, rs3134070, respectivamente) localizados en el promotor, A6890C (rs7844539) localizado en el intrón 4 y G1181C (rs2073618) localizado en el exón 1. Previamente, para el estudio de genotipado, hubo que establecer un grupo control. Éste consistió en 92 muestras de DNA procedente de voluntarios sanos, proporcionadas por el Biobanco del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe*. Estas muestras se emplearon para determinar el rango de los polimorfismos en la población general española y para corroborar que no existían diferencias con la población caucásica descrita en las bases de datos disponibles en la red (*European HapMap* o PDR90 general).

3.2.4.2.4 Lesiones isquémicas en parénquima cerebral

Se realizó a todos los pacientes al menos un examen TC de parénquima cerebral. Las exploraciones se realizaron utilizando un equipo de TC Siemens Somatom Sensation 64 Multidetector (Siemens AG, Forchheim, Germany). El estudio de cráneo se planificó desde el agujero magno el hasta vertex craneal, alineado sobre la línea orbitomeatal perpendicular a la mesa, con un grosor de corte de 3 mm y un incremento de 1.5 mm. Se obtuvieron imágenes axiales en ventana ósea y de parénquima cerebral.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas por 2 radiólogos de forma independiente y clasificadas según las siete categorías establecidas en la Clasificación de Stevens⁽²³⁵⁾ (Tabla 3.1).

Tabla 3.1

Clasificación de Stevens para las lesiones isquémicas en la *TC de parénquima cerebral*

1	Lesiones subcorticales hipodensas de pequeño tamaño y bien circunscritas. Por lo general de poco más de 1 cm de tamaño, adyacente a la corteza cerebral, pero sin afectarla; en territorio de arteria cerebral anterior y media
2	Grandes infartos corticales ocupando por lo general >50% del territorio de la arteria cerebral anterior y media
3	Infartos corticales pequeños que ocupan por lo general <50% del territorio de la arteria cerebral anterior y media
4	Una o más lesiones en los ganglios basales o Tálamo. Infartos de los ganglios basales por lo general de alrededor de 1 cm
5	Infartos en surcos que involucra a cortical y subcortical, que corresponden a zonas periféricas del territorio de la arteria cerebral media
6	Afectación difusa de la sustancia blanca; cambios mal delimitados en la sustancia blanca a menudo bilaterales
7	Estado lacunar. Múltiples lesiones hipodensas que afectan a los ganglios basales y al tálamo bilateralmente

Las categorías de 1 a 5 son consideradas como “embólicas” mientras que las categorías de 6 a 7 se consideran como “no embólicas”.



3.2.4.3 Variables modificadoras o de confusión

3.2.4.3.1 Variables universales

Se registró edad y sexo de todos los pacientes.

3.2.4.3.2 Medidas antropométricas

Se cuantificó el peso (Kg), la talla (cm) para posteriormente calcular el índice de masa corporal (IMC). También se midió el perímetro de la cintura (cm) para valorar el componente de obesidad abdominal, que se estableció en >102 cm para hombres y >88 cm para mujeres; también se cuantificó el perímetro de la cadera (cm).

3.2.4.3.3 Factores de riesgo cardiovascular clásicos

Se recogió de la historia del paciente la presencia de hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus, e hiperlipidemia. Tanto en el cuestionario de inclusión como en el de control a los 12 meses, se realizó una medición de la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD) en mmHg. Se registró el hábito tabáquico como: fumador activo, no fumador o exfumador. La presencia de cardiopatía isquémica e isquemia vascular cerebral se evaluaron según los criterios del ítem correspondiente del cuestionario WHO-MONICA⁽²³⁶⁾, que hacen referencia a las diferentes fuentes a partir de las cuales se obtiene el diagnóstico (informes médicos de atención primaria, atención especializada, ingresos hospitalarios y exploraciones complementarias entre otros). La isquemia crónica de los miembros inferiores fue valorada mediante el índice tobillo/brazo (ITB) o cociente entre presión sistólica en la extremidad inferior y la presión sistólica humeral. Consideramos patológico un ITB<0,9⁽²³⁷⁾.

3.2.4.3.4 Parámetros bioquímicos

Se realizaron a partir de muestras de suero o sangre periférica empleando protocolos estandarizados de extracción. Según dicho protocolo, se extrajeron tres tubos de sangre:

1. Sangre total con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Se utilizó para el estudio de la serie hematológica. Este tubo se congeló posteriormente a -20°C , para los estudios genéticos posteriores.

2. Sangre total con citrato como anticoagulante. Se utilizó para la determinación de proteínas de la coagulación.

3. Suero sin anticoagulante. Se utilizó para la determinación de proteínas y enzimas séricas. Una vez hechas las pruebas incluidas en el protocolo, el suero se separó y se congeló a -20°C . Este suero se utilizó posteriormente para la determinación de OPG y OPN.

Se determinaron los niveles plasmáticos de creatinina (mg/dl), colesterol (total, LDL, HDL) (mg/dl), triglicéridos (mg/dl), fibrinógeno (mg/l), leucocitos ($\text{n}^{\circ}/\text{ml}$), proteína C reactiva ultrasensible (mg/l), homocisteína ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y Lipoproteína a (Lp(a)) (mg/dl). Para la valoración específica del metabolismo Calcio-Fósforo (Ca-P) se determinó la cantidad de Ca (en plasma y orina de 24 horas) (mg/dl), P (plasma y orina de 24 horas) (mg/dl), vitamina D (ng/ml), PTH (pg/ml), OPG (pmol/L) y OPN (ng/ml), estas dos últimas en suero.

La creatinina, el colesterol, Ca y P se determinaron mediante técnicas colorimétricas. La PCR y Lp(a) mediante inmunoturbidimetría. La Vitamina D y la PTH se determinó mediante técnicas de electroquimioluminiscencia. La homocisteína se calculó por ensayo enzimático. Los cálculos del fibrinógeno correspondieron al cálculo



del fibrinógeno derivado, calculado a través del tiempo de protrombina (coagulometría).

La concentración de la proteína OPG se cuantificó en el suero de los pacientes mediante ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), con el *kit* comercial *Human Osteoprotegerin ELISA* (Biovendor, República Checa), siguiendo las condiciones descritas por los fabricantes en el protocolo suministrado con el *kit*. Se trata de un *kit* de ELISA directo en el cual tanto las diluciones estándar como los controles de calidad (ambos suministrados con el *kit*) y las muestras de suero de los pacientes, se incubaron durante 60 minutos con un anticuerpo monoclonal anti-OPG humano. Posteriormente, y tras lavar la placa, se realizó una nueva incubación de 60 minutos con un anticuerpo policlonal marcado con biotina. Nuevamente, se lavó la placa y se incubó 30 minutos con un conjugado estreptavidina-HRP (*horseradish peroxidase*). Tras un último lavado, se añadió una solución sustrato (TMB [3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*]) produciéndose una reacción colorimétrica que se detuvo a los 10 minutos mediante la adición de una solución ácida. La absorbancia del producto se determinó con un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Se realizó una curva con los valores de absorbancia de las diluciones estándar conocidas y los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en dicha curva para obtener la concentración de OPG presente en las muestras de estudio.

La determinación de OPN se realizó mediante ELISA empleando el *kit RayBio® Human Osteopontin ELISA* (RayBiotech, Inc., GA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se trata de un *kit* de ELISA directo en el cual tanto las diluciones estándar como los controles de calidad (ambos suministrados con el sistema) y las muestras de suero de los pacientes, se incubaron durante 2,5 horas con

un anticuerpo monoclonal anti-OPN humano. Posteriormente, y tras lavar la placa, se realizó una nueva incubación de 60 minutos con un anticuerpo policlonal marcado con biotina. Nuevamente, se lavó la placa y se incubó 45 minutos con un conjugado estreptavidina-HRP. Tras un último lavado, se añadió una solución sustrato (TMB) produciéndose una reacción colorimétrica que se detuvo a los 30 minutos mediante la adición de una solución ácida. La absorbancia del producto se determinó con un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Se realizó una curva con los valores de absorbancia de las diluciones estándar conocidas y los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en dicha curva para obtener la concentración de OPN presente en las muestras de estudio.

3.2.4.3.5 Tratamientos intercurrentes

Se registraron los fármacos de consumo habitual por parte de los pacientes al inicio del estudio, incluyendo principio activo y posología. Así mismo, todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento de prevención secundaria protocolizado por los Servicios de Neurología y Angiología y Cirugía Vascular:

- Tratamiento antiagregante con ácido-acetil-salicílico (AAS), 100 mg/día vía oral, en pacientes asintomáticos; 300 mg/día de AAS oral en pacientes previamente sintomáticos o clopidogrel 75 mg/día oral, en aquellos pacientes con alergia o intolerancia al AAS.
- Estatinas con el objetivo de realizar prevención primaria en pacientes asintomáticos, con niveles de LDL-colesterol iguales o superiores a 160 mg/dl o secundaria (LDL-colesterol por encima de 100-130 mg/dl, dependiendo de la



presencia de patología coronaria asociada), según recomendaciones de la guía *Adult Treatment Panel (ATP III)*⁽²³⁸⁾.

3.2.5 CONTROL DE SESGOS

En el estudio preliminar referenciado al inicio del capítulo se analizó la precisión de la AngioTC para el cálculo de la masa de Ca. Se realizó a partir de pacientes con estenosis >70% considerados para endarterectomía carotídea. Las piezas quirúrgicas fueron incineradas y la masa de sus cenizas residuales (98% hidroxapatita) enfrentadas, en un modelo de regresión lineal simple, a las mediciones realizadas mediante AngioTC para valorar su precisión.

Así mismo, se evaluó la precisión del eco-Doppler en la identificación de estenosis >50% a partir de estudios, comparando sus resultados con los de la AngioTC⁽²³⁹⁾.

Por otra parte, los investigadores que procesaron cada una de las pruebas estaban “cegados”, respecto a los resultados de las restantes, y las muestras biológicas se identificaron mediante un código de registro interno. Se aplicaron técnicas de análisis multivariante para identificar y controlar posibles variables de confusión o modificadoras de efecto.

3.2.6 RECOGIDA DE DATOS

La recogida de datos se realizó en el momento de la inclusión en la cohorte y a los 12 meses salvo por salida voluntaria del estudio o pérdida de seguimiento. Las

determinaciones a realizar en todos los pacientes en cada uno de los intervalos aparecen reflejadas en la Tabla 3.2:

Tabla 3.2
Cronograma de las acciones a realizar durante el estudio

Acciones	Mes 0	Mes 12
Cuestionario	✓	✓
Medidas antropométricas	✓	✓
Analítica	✓	✓
Muestra de sangre (suero+ADN)	✓	
AngioTC	✓	✓
Desnsitometría ósea	✓	✓
ECG	✓	
Presión arterial	✓	
Índice de masa corporal	✓	



3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron recogidos en un libro de Excel versión 21.3.6 (*Microsoft Corp*, Redmond, WA, USA) diseñado para tal efecto.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete informático SPSS, versión 13.0 (*SPSS INC*, Chicago, IL, USA).

Se realizó un análisis estadístico descriptivo: media y desviación estándar (DE) de las variables cuantitativas; comparación de proporciones (*Chi-cuadrado*) para variables dicotómicas y prueba T para la comparación entre medias.

Se utilizó el análisis del coeficiente de correlación para cuantificar un posible error de medición. La concordancia intra e interobservador se determinó mediante el coeficiente de correlación entre las observaciones intraclase y a partir del promedio de 2 mediciones por 2 exploradores independientes (interclase). Se utilizó la representación gráfica de *Bland Altman* para mostrar los resultados. Ésta consiste en representar, en un diagrama de dispersión la media de las dos mediciones como la mejor estimación del verdadero valor, frente a la diferencia absoluta entre los dos valores. El gráfico incluye, además, una línea horizontal en la diferencia media y dos líneas (límites de concordancia), a una distancia de dos desviaciones estándar por arriba y por debajo de la primera; de esta manera podemos expresar gráficamente el grado de acuerdo entre las mediciones.

Para valorar la precisión de la AngioTC (medición volumétrica de la bifurcación carotídea) en la valoración del grado de ECI con respecto a la AngioTC (2D MIP) y eco-Doppler se realizaron estudios de sensibilidad, especificidad, índice kappa y curvas operador receptor (COR) para estimar los puntos de corte óptimo. La

progresión/regresión de la placa carotídea se analizó mediante la comparación de medias (prueba T) para medidas repetidas e independientes entre pacientes con y sin aumento del contenido de Ca y para las medidas repetidas entre las determinaciones basales y al final del período de seguimiento.

Se creó una matriz de correlaciones para identificar variables relacionadas. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple considerando la variación en el volumen de pared arterial (promedio de ambas bifurcaciones carotídeas) a los 12±2 meses como variable dependiente. Variables independientes: contenido de Ca, basal y su variación (promedio de ambas bifurcaciones carotídeas) a los 12±2 meses, y otras variables explicativas y de confusión.

Asímismo, se analizó la correlación entre contenido de Ca en la pared arterial y parámetros del estudio de metabolismo Ca/P y densitometría ósea. En el análisis de regresión lineal simple y múltiple, se consideró la variación en el contenido del Ca en la pared arterial a los 12 meses (±2 meses), como variable dependiente. Las variables independientes consideradas fueron la densidad de calcio óseo basal (densitometría) y su variación a los 12 meses (±2 meses), cruda y tras el ajuste por otras variables clínicas y del metabolismo Ca/P.

Las frecuencias genóticas de casos y controles se analizaron mediante χ^2 o *test de Fisher*. La comparación entre las medidas de OPG según el genotipo de los pacientes se realizó mediante el *test de Pearson*. El estudio de los parámetros continuos se realizó aplicando el test de correlación de *Pearson*.

En todas las pruebas mencionadas, se consideró significativa una $p < 0,05$ en contrastes bilaterales.



3.2.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este estudio respeta los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos; cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

La obtención de datos y muestras biológicas se realizó mediante entrevista con participación voluntaria de las personas y su procesamiento fue ejecutado por profesionales sanitarios sujetos a secreto profesional, previa firma de un consentimiento informado escrito (Anexos 8.1 y 8.2).

El protocolo fue autorizado por el comité de Ética en Investigación Clínica (CEIC) del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe* (Anexo 8.3), y por la Comisión de Investigación Clínica del H.U. La Fe (Anexo 8.4).

Los controles para el genotipado procedentes de voluntarios sanos, son cesiones del *Biobanco del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Biobanco La Fe) PT13/001/0026*, cumpliendo con la normativa establecida para ello.

Las bases de datos se sometieron a un proceso de anonimización, con sustitución de los datos identificativos por un código numérico, que fue el empleado en el tratamiento de los datos en todas sus fases posteriores.

4. RESULTADOS

Siguiendo las pautas introducidas en el apartado anterior, los resultados del estudio se presentan según el esquema siguiente:

4.1 ESTUDIO PILOTO. (Cuantificación y caracterización del calcio carotídeo con AngioTC en pacientes neurológicamente sintomáticos y asintomáticos).

4.2 ESTUDIO ACTUAL (Cuantificación del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante AngioTC: perfil evolutivo y relación con la progresión del grado de estenosis volumétrica).

4.2.1 (*objetivo 2.2.1.1*). Medición volumétrica de la bifurcación carotídea. Concepto alternativo a la gradación de estenosis.

4.2.2 (*objetivo 2.2.1.2*). A. Determinación del calcio intraplaca y su relación con la progresión de la ateromatosis carotídea. B. Papel protector de la calcificación carotídea frente al desarrollo de sintomatología tromboembólica.

4.2.3 (*objetivo 2.2.2.1*). Calcificación arterial y descalcificación ósea. Relaciones entre ambos procesos.

4.2.4 (*objetivo 2.2.2.2*). Relación entre los polimorfismos genéticos del gen de la OPG (*tnfsf11b*) y la progresión de la calcificación en la placa de ateroma.



4.1 ESTUDIO PILOTO

Cuantificación y caracterización del calcio carotídeo con AngioTC en pacientes neurológicamente sintomáticos y asintomáticos

Antes de desarrollar los resultados del estudio actual según los apartados expuestos, es necesario exponer los del estudio piloto realizado con anterioridad por nuestro grupo⁽⁵⁾ y que, como ya se comentó en el capítulo anterior, permite sustentar metodológicamente este trabajo.

En este estudio de casos (pacientes sintomáticos, n=19) y controles (asintomáticos, n=13), la estimación del contenido de Ca mediante AngioTC a partir de ASm demostró una buena correlación con la medición directa de la masa y el volumen de Ca (Fig. 4.1) tras la incineración de placas carotídeas procedentes de endarterectomía ($r=0,911$ y $0,993$, respectivamente, $p<0,005$). Estos datos indican que la AngioTC predijo en el 83% y 98,7% (R^2) la variabilidad observada en la medición directa de la masa y el volumen de Ca, respectivamente.

Estos resultados y las mediciones basadas en las AngioTC correspondientes, se utilizaron para diseñar una ecuación de regresión lineal con el fin de normalizar los resultados de la tomografía.

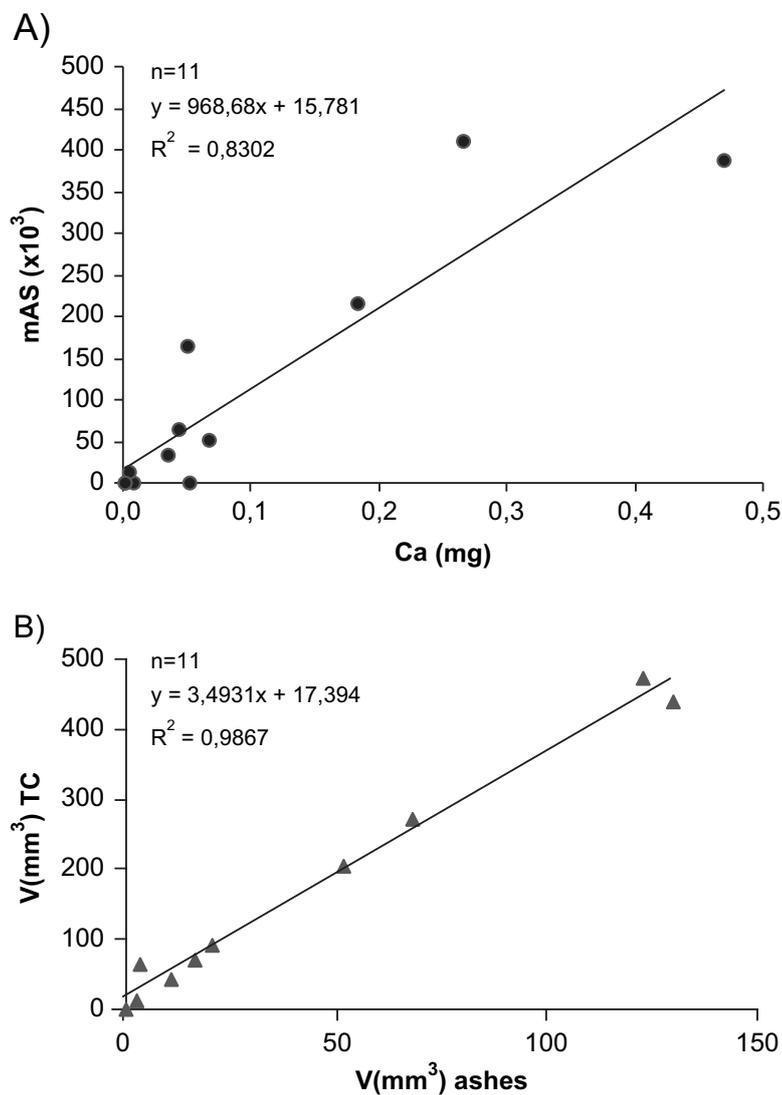


Figura 4.1 Gráficos de regresión comparando los resultados de masa de calcio (A) y volumen de Ca (B), medidos a partir de las cenizas de las muestras quirúrgicas de endarterectomía carotídea (eje X) y valores obtenidos a partir de la AngioTC (eje Y). Tomado de Miralles y cols. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2006.

La determinación del contenido de calcio con esta metodología mostró la presencia de mayor cantidad de Ca en las placas de los pacientes asintomáticos con respecto a los pacientes sintomáticos (ASm: $122,6 \pm 138,0$ vs $42,8 \pm 59,1$ HUxmm³, $p=0,04$) (Fig. 4.2).

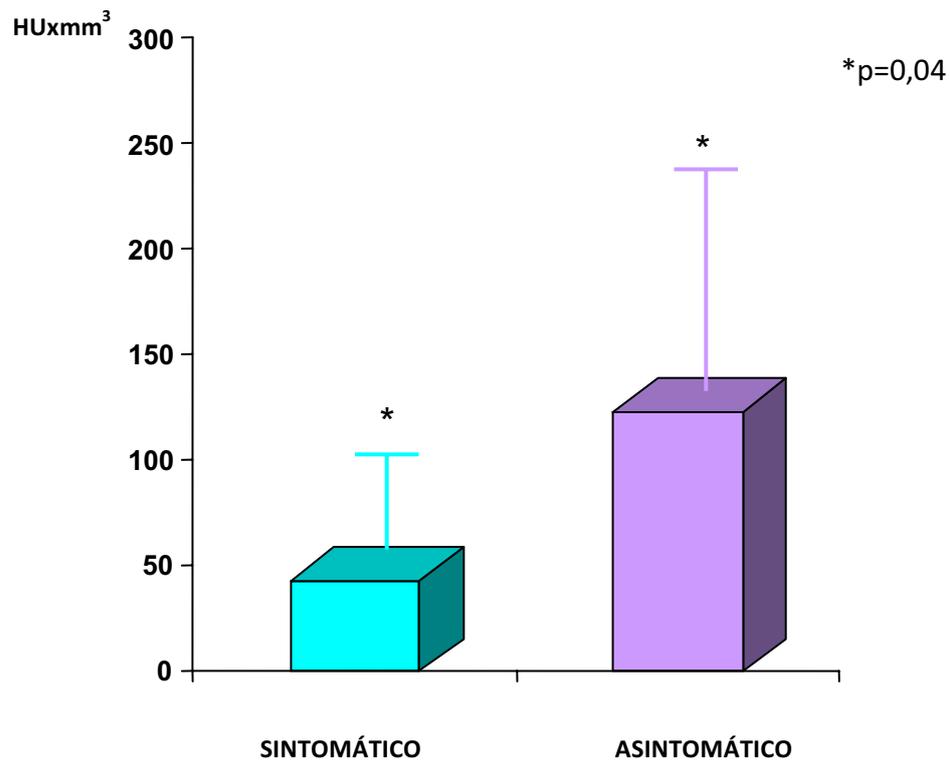
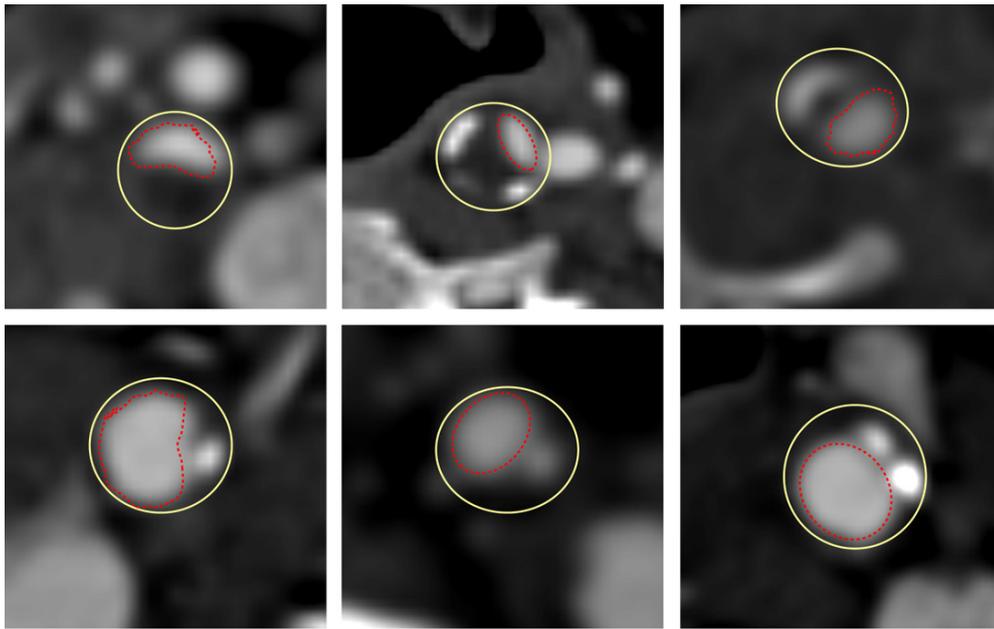


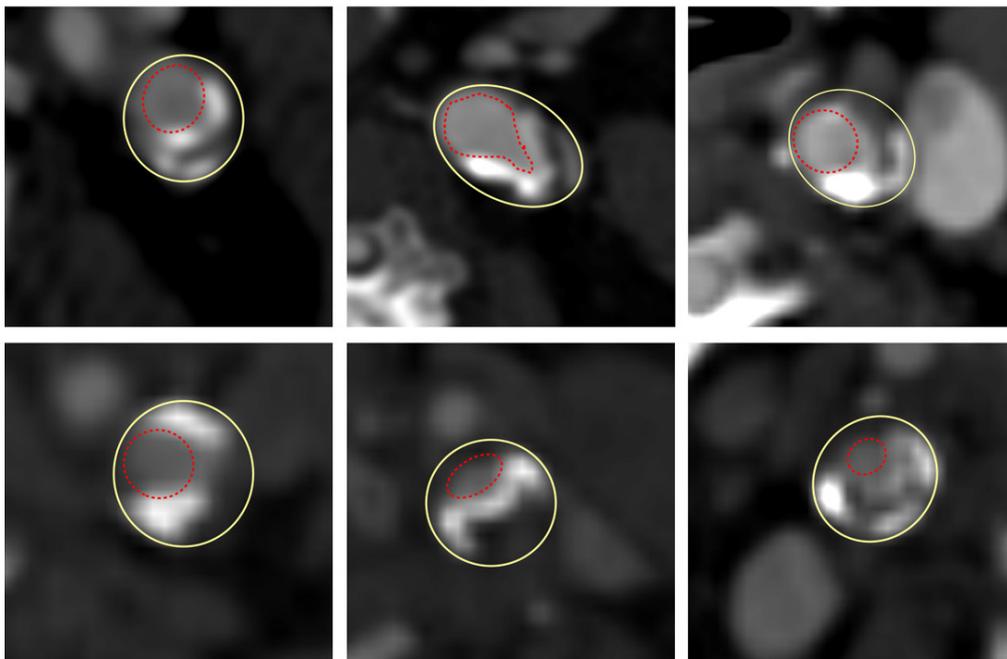
Figura 4.2 Determinación del contenido de Ca en pacientes sintomáticos y asintomáticos. Tomado de Miralles y cols. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2006.

*Media \pm DE ($p=0,04$).

Por otro lado, la distribución del calcio en la placa de los pacientes asintomáticos con frecuencia se encontraba en la superficie de la placa respecto a la distribución en los pacientes sintomáticos (9/12 vs 3/15, $p=0,006$) (Fig. 4.3).



A. *Pacientes sintomáticos*



B. *Pacientes asintomáticos*

Figura 4.3 Distribución de calcificaciones intraplaca en pacientes. El Ca mineral se localiza preferentemente en la base de la lesión en los sintomáticos **(A)** y en los ángulos o superficie luminal en los asintomáticos **(B)**. Tomado de Miralles y cols. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2006.



4.2 ESTUDIO ACTUAL

Cuantificación del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante AngioTC: perfil evolutivo y relación con la progresión del grado de estenosis volumétrica

54 participantes fueron incluidos inicialmente en el estudio en función de los criterios establecidos. Dos pacientes fueron perdidos del seguimiento a los 12 meses. Se produjeron 5 fallecimientos en dicho periodo: 2 por infarto agudo de miocardio, 1 por accidente vascular cerebral y 2 por causa no filiada. Dos pacientes fueron retirados del estudio por requerir endarterectomía carotídea por sintomatología neurológica, antes del año de seguimiento. Por tanto, 45 pacientes finalizaron el seguimiento y fueron objeto del análisis final de resultados correspondientes a los objetivos primarios.

El número de muestras analizadas para algunos los objetivos secundarios, fue más reducido por los motivos que se exponen en los apartados correspondientes.

4.2.1 MEDICIÓN VOLUMÉTRICA DE LA BIFURCACIÓN CAROTIDEA. CONCEPTO ALTERNATIVO A LA GRADACIÓN DE LA ESTENOSIS

Cuarenta y cinco pacientes (90 bifurcaciones carotídeas) fueron incluidos inicialmente en el estudio y valorados con eco-Doppler y AngioTC en situación basal y tras 12±2 meses de seguimiento. Los datos de ambas exploraciones no pudieron ser contrastados en 7 bifurcaciones carotídeas (6 por interferencia de calcio en las proyecciones MIP 2D y otra por oclusión). Por tanto, se analizaron 83 bifurcaciones carotídeas.

La estimación a partir de imágenes 2D MIP (AngioTC) confirmó los hallazgos del eco-Doppler en 23/30 ECI <50% y 48/53 ECI >50% (Sens=0,91; Esp=0,77% kappa=0,68).

La medición volumétrica de la bifurcación carotídea mostró una concordancia intra e interobservador con un CCI de 0,96 (IC95%: 0,904-0,985) (Fig 4.4 A) y 0,94 (IC95%: 0,822-0,977) (Fig. 4.4 B), respectivamente. La inspección del gráfico de Bland-Altman (Fig. 4.4 C), demostró una dispersión localizada en el rango $\pm 1,96$ DE de la media de las diferencias entre las mediciones de los 2 exploradores (eje X) frente a su promedio (eje Y).

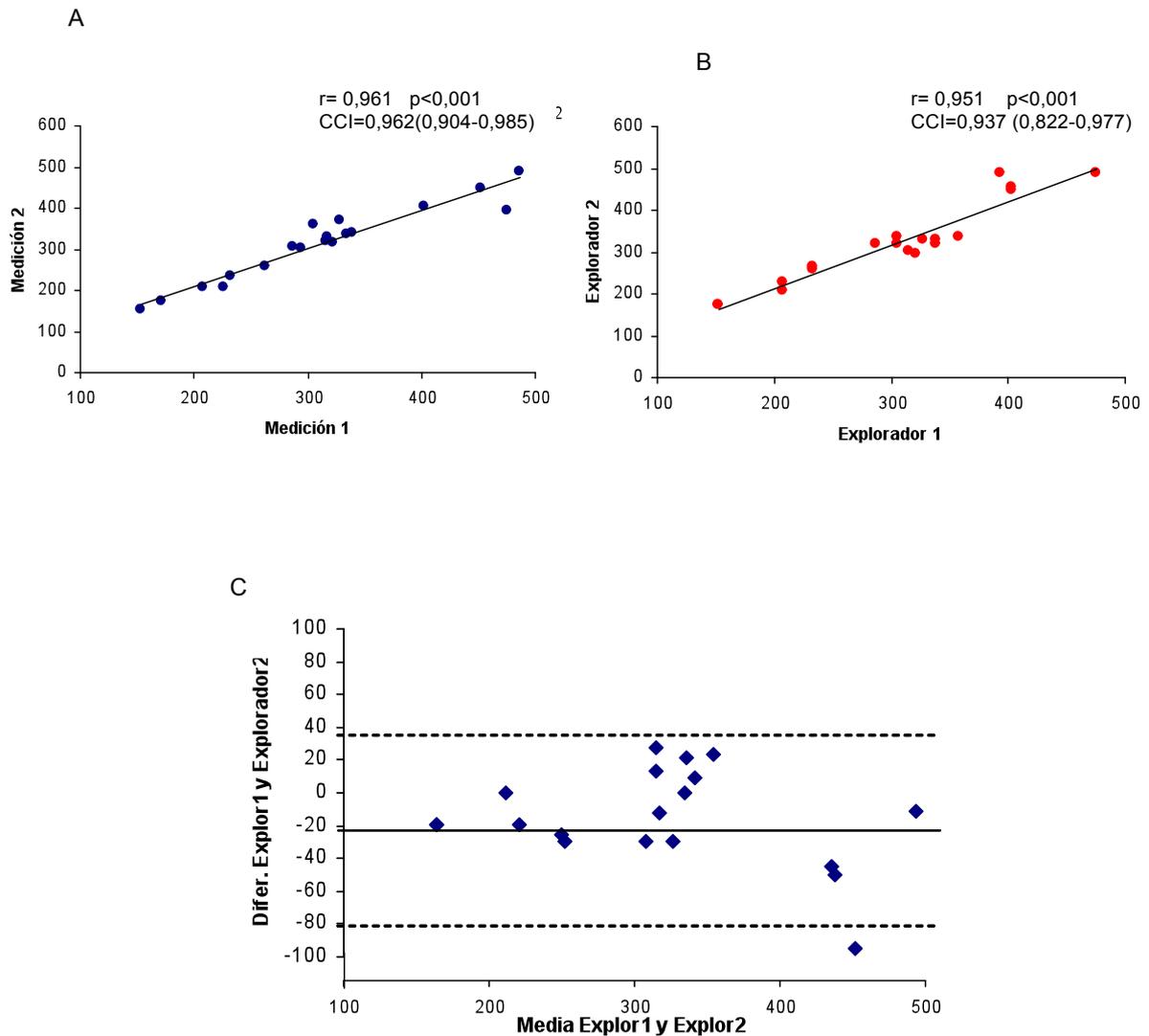


Figura 4.4 Concordancia intraobservador **(A)** e interobservador **(B)** coeficiente de correlación (r) y de correlación intraclase (CCI [IC 95%]) Gráfico de Bland-Altman Media de la diferencia entre las mediciones de ambos exploradores (línea continua) y $\pm 1,96$ DE (líneas discontinuas) **(C)**.

El VBif/VCP del grupo de ECI $< 50\%$ fue de $5,2 \pm 1,8$ frente a $3,8 \pm 1,3$ en el de ECI $> 50\%$ ($p = 0,001$). El punto de corte óptimo de la relación VBif/VCP se identificó a partir de la curva COR en 4,1 (Sens=0,75; Esp=0,75, kappa=0,49) (Fig. 4.5).

A los 12 meses, se observó una reducción del volumen promedio de la bifurcación carotídea respecto al valor basal ($475,45 [155,6] \text{ mm}^3 \times \text{UH}$ vs $501,3 [171,9] \text{ mm}^3 \times \text{UH}$ $p = 0,04$). Se observó progresión de la ateromatosis carotídea en 32 bifurcaciones (14

ECI <50% y 18 ECI >50%), con una reducción del volumen de la bifurcación de 137,8 (71,4) mm³xUH, p<0,001 y regresión en 27 (18 con ECI<50% y 9 con ECI>50%), con un aumento del volumen de la bifurcación de 106,4 (57,9) mm³xUH, p<0,001. Veinticuatro mediciones permanecieron estables respecto al valor inicial según los criterios considerados. En la Fig. 4.6 se aprecia la distribución de valores del cociente entre volumen VBif y VCP, según el grado de estenosis por AngioTC (2D MIP).

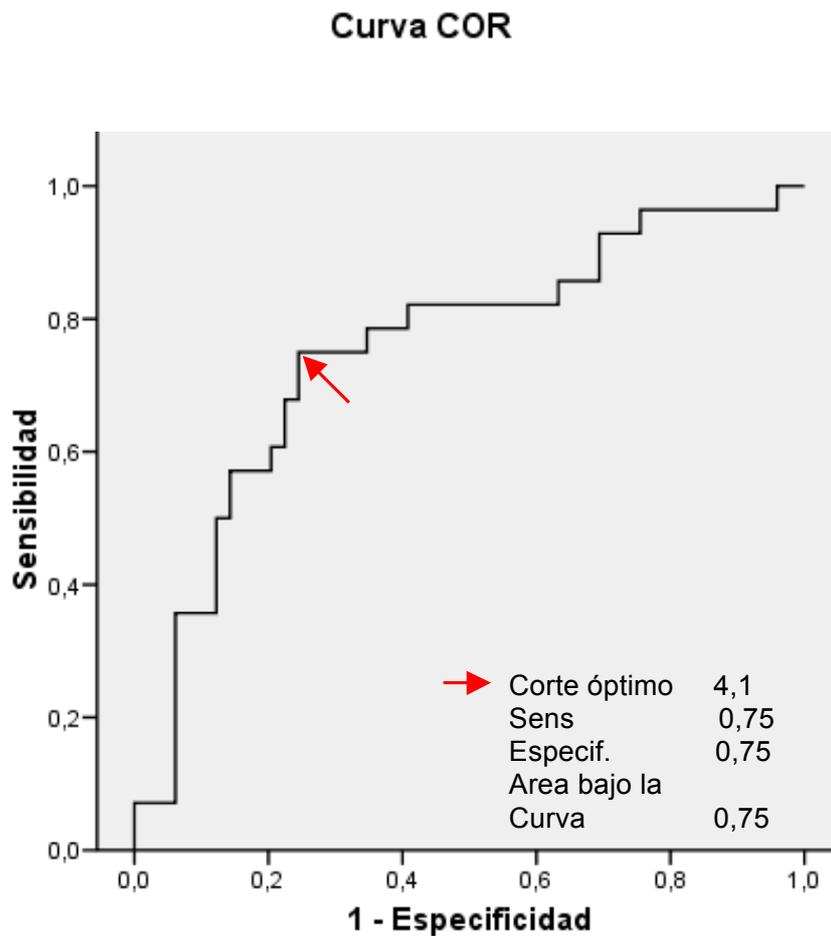


Figura 4.5 Curva operador–receptor (COR) para identificar el punto de corte óptimo (4,1) que define equivalencia para ECI>50% (AngioTC MIP 2D) con precisión máxima.

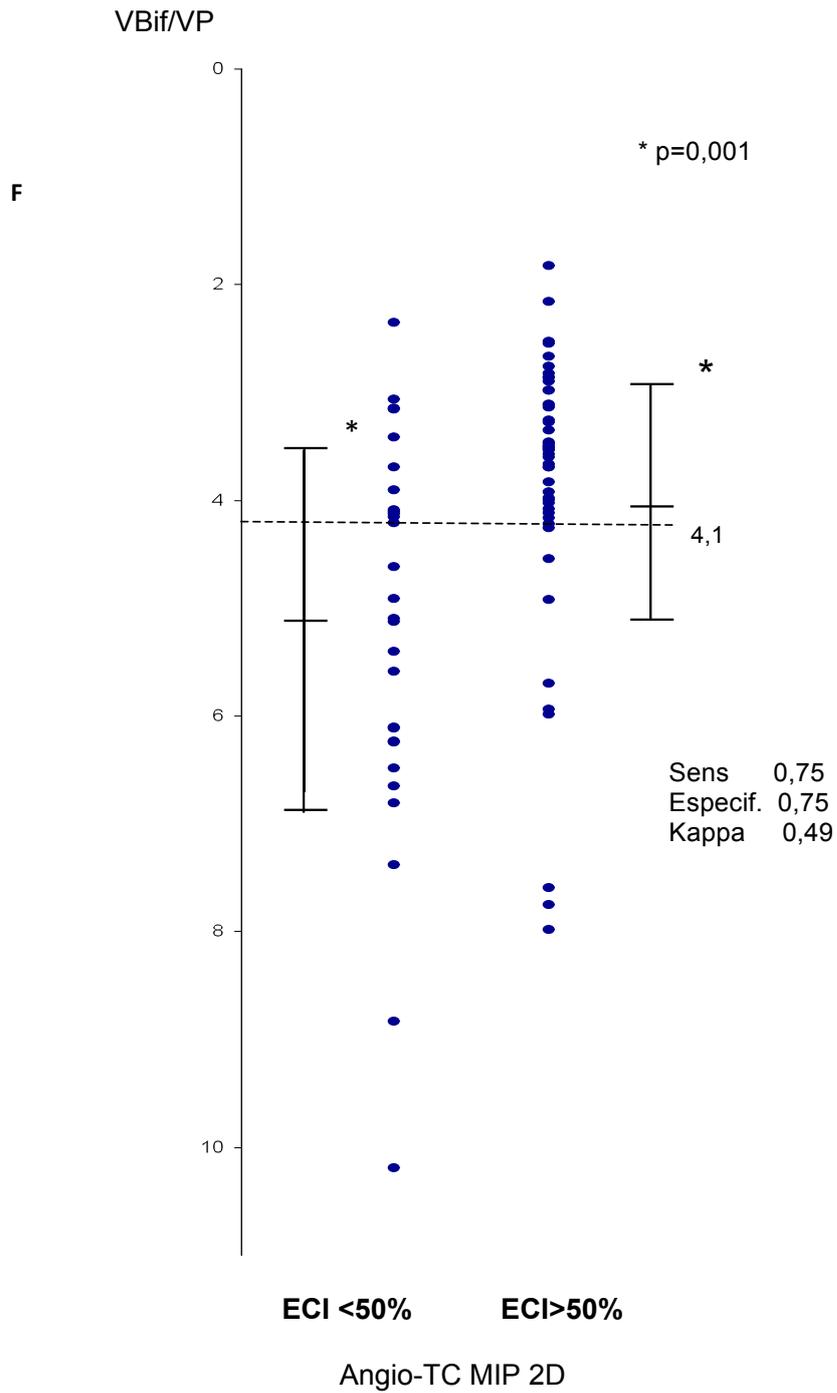


Figura 4.6 Distribución de valores del cociente entre volumen de bifurcación (VBif) y un segmento proximal de 1 cm de arteria carótida primitiva (VP), según el grado de estenosis por AngioTC (2D MIP).

4.2.2 DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRAPLACA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA

Tal y como se ha comentado al inicio de la sección, de los 54 pacientes incluidos inicialmente, 9 fueron excluidos durante el seguimiento: 2 pacientes por pérdida, 5 por fallecimiento y 2 por requerir endarterectomía carotídea. Por tanto 45 pacientes finalizaron el seguimiento y fueron objeto del análisis final de resultados.

Todos los pacientes presentaban ECI=50-70% en el examen con eco-Doppler basal (unilateral en 25 pacientes, 55,6 % y bilateral en 20, 44,4%) y todos eran neurológicamente asintomáticos.

No obstante, el examen TC de parénquima cerebral reveló en 8 pacientes lesiones <1cm localizadas en la región subcortical, tálamo y los ganglios de la base, siendo consideradas como lesiones lacunares. Nueve pacientes presentaban lesiones difusas en zonas limítrofes o áreas vasculares mal definidas y fueron clasificadas como defectos de perfusión. En 9 casos se identificaron lesiones de gran tamaño compatibles con procesos isquémicos de origen embólico; cuatro de ellos (8,9%) presentaban una ECI ipsilateral del 50-70%.

A los 12 meses, se observó una reducción del volumen promedio de la bifurcación carotídea respecto al valor basal (475,45 (155,6) mm³xUH vs. 501,3 (171,9) mm³xHU p=0,04). Se observó progresión de la AE carotídea en 29 bifurcaciones (12 ECI <50% y 17 ECI >50%), con una reducción del volumen de la bifurcación de 137,8 (71,4) mm³xHU, p<0,001 y regresión/remodelación en 22 (16 con ECI <50% y 6 con ECI >50%), con un aumento del volumen de la bifurcación 106,4 (57,9) mm³xHU, p<0,001. Permanecieron estables 27 mediciones respecto al valor inicial según los criterios



establecidos (Fig. 4.7 A). Los criterios de progresión se consideraron a partir de un incremento del volumen de la pared arterial (disminución volumen de la bifurcación carotídea) >10%, respecto a basal; la regresión se consideró cuando obtuvimos una disminución del volumen de la pared arterial (aumento del volumen de la bifurcación carotídea) >10%, respecto al valor basal. No pudieron valorarse las imágenes en 7 bifurcaciones: en 3 pacientes (6 carótidas) por artefactos durante la adquisición en uno de los dos exámenes de AngioTC y en 1 carótida hubo una oclusión.

Las determinaciones del contenido de Ca intraplaca a partir de su estimación mediante ASm (volumen total x densidad radiológica promedio [UH]) reveló un aumento estadísticamente significativo del Ca intraplaca (56,8 [52,3] vs. 64,58 [57,8] mm³xHU, p=0,002) (Fig. 4.7 B).

Los datos demográficos, factores de riesgo vascular, comorbilidad cardiovascular y tratamientos concomitantes aparecen reflejados en la Tabla 4.1. Tan sólo la hipertensión arterial y la diabetes presentaban prevalencias significativamente superiores entre los pacientes en los que se detectó progresión de la estenosis volumétrica en el promedio de ambas bifurcaciones carotídeas. Los valores promedio y desviación estándar de los parámetros antropométricos, bioquímicos y del metabolismo Ca-P distribuidos en función del incremento de la estenosis volumétrica y de la progresión del contenido de Ca en la placa aparecen recogidos en la Tabla 4.2. No se registraron diferencias en la comparación de medias (prueba T) entre los distintos parámetros en relación con la progresión de estenosis volumétrica ni contenido de calcio en el promedio de ambas bifurcaciones carotídeas (Tabla 4.2).

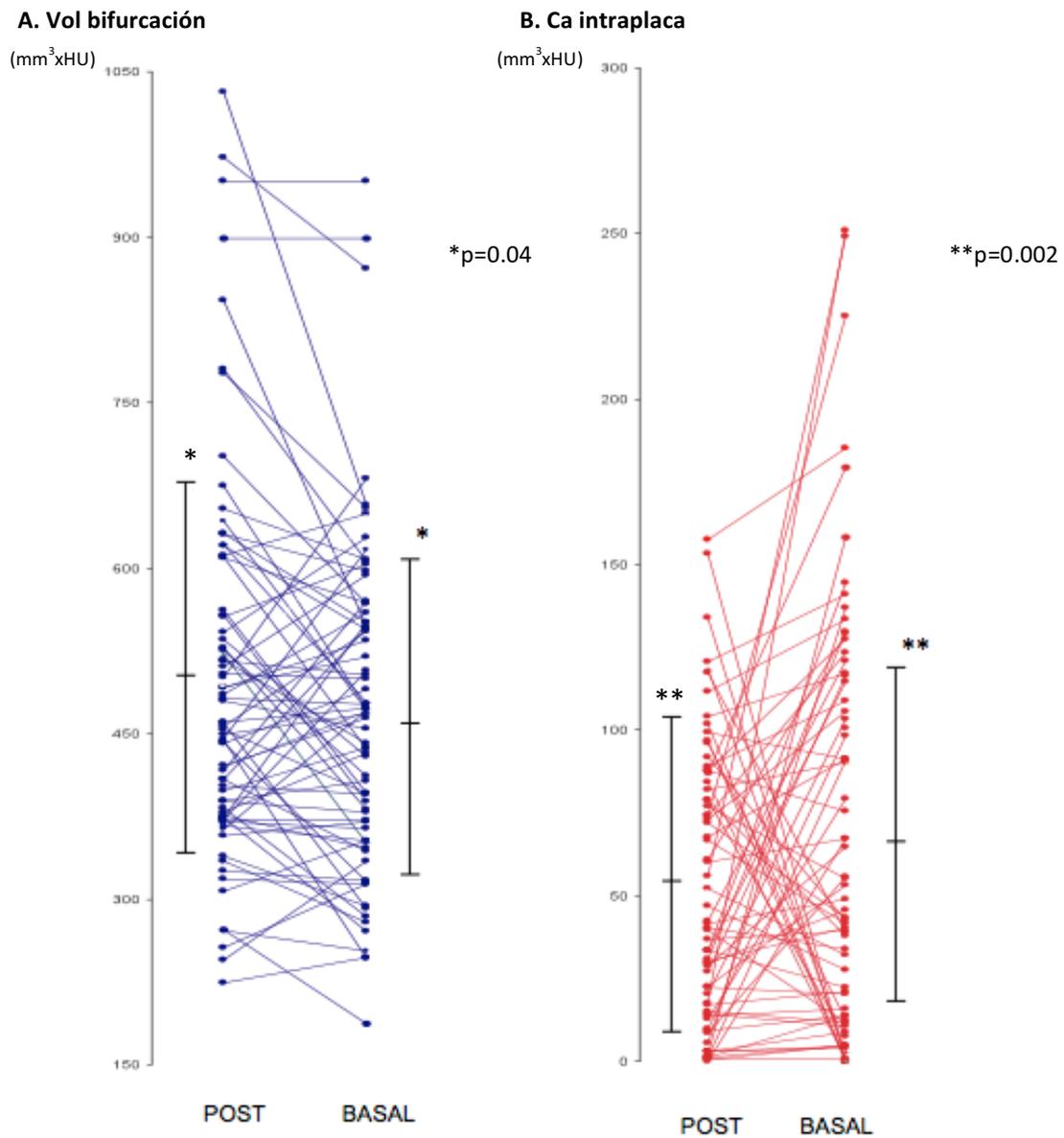


Figura 4.7 Variación en el volumen de la pared arterial en bifurcación carotídea (estimada a partir del volumen de la columna de contraste) (A). Contenido de Calcio (ASm) entre la determinación basal y a los 12 meses(B).



Tabla 4.1

Datos demográficos, factores de riesgo vascular, comorbilidad cardiovascular y tratamientos concomitantes, distribuidos en función del incremento de la estenosis volumétrica y de la progresión del contenido de Ca en la placa.

Parámetros	<i>ΔVolumen bifurcación carotídea</i>			<i>ΔContenido Ca intra-placa</i>	
	n (%)	Progresión* n (%)	P	Progresión** n (%)	P
Sexo (Varón)	37(92,5)	18 (48,6)	0,548	26 (70,3)	0,896
Tabaquismo	10(25)	4 (40,0)	0,714	7 (70)	0,970
DMNID	14(35)	10 (71,4)	0,048	10 (71,4)	0,885
DMID	3 (7,5)	2 (66,7)	0,896	2 (66,7)	0,896
Dislipemia	25 (62,5)	13 (52,0)	0,744	19(76)	0,477
HTA	35 (87,5)	20 (57,1)	0,047	26(74,3)	0,149
Cardiopatía isquémica	16(40)	9(56,3)	0,748	13(81,3)	0,297
Isquemia extremidades inferiores (ITB<0,9)	34(85)	18(52,9)	0,661	24(70,6)	0,847
Antiagregantes	38(95)	18(47,4)	0,487	27(71,1)	0,515
Estatinas	28(70)	20(71,4)	0,763	20(71,4)	0,763
Dicumarínicos	3(7,9)	2(66,7)	0,946	2(66,7)	0,946

*Incremento volumen pared arterial (disminución volumen bifurcación carotídea)>10%, respecto a basal.

** Incremento contenido de Ca>10%, respecto a basal.

Tabla 4.2

Media y desviación estándar de datos antropométricos, bioquímicos y metabolismo del Ca-P distribuidos en función del incremento de la estenosis volumétrica y de la progresión del contenido de Ca en la placa.

Parámetros	Δ Volumen bifurcación carotídea			Δ Contenido Ca intra-placa		
	Estabil/Regres	Progresión*	P	Estabil/Regres	Progresión**	P
	<i>Media (DE)</i>	<i>Media (DE)</i>		<i>Media (DE)</i>	<i>Media (DE)</i>	
Edad	65,4(10)	66,9 (8,7)	0,615	66,1(8)	66,2(9,9)	0,977
IMC	26,7(4,8)	27(2,9)	0,837	26,7(4,8)	27(2,9)	0,977
ITB menor	0,65(0,27)	0,59(0,22)	0,212	0,55(0,26)	0,65(0,24)	0,212
Creatinina (mmol/l)	0,98 (0,26)	1,21(0,52)	0,077	0,96(0,19)	1,15(0,47)	0,195
Colesterol Total (mmol/l)	121,37 (55,15)	186,26(37,14)	0,096	202,58(52,12)	197,81(47,33)	0,781
LDL colesterol (mmol/l)	120,00 (56,60)	102,41(30,97)	0,297	97,37(36,97)	114,10(44,85)	0,360
HDL colesterol (mmol/l)	46,58(10,79)	51,35(11,22)	0,262	47,00(13,86)	50,45(9,85)	0,449
Triglicéridos (mmol/l)	159,26 (129,41)	171,89(129,54)	0,765	223,08(205,05)	139,04(58,15)	0,059
Proteína C-reactiva (mg/dl)	7,23(8,73)	34,00(122,20)	0,374	52,64(151,27)	5,30(5,84)	0,137
Fibrinógeno (mg/l)	378,44(70,96)	371,35(80,92)	0,784	377,09(91,25)	374,04(68,35)	0,913
Plaquetas ($10^3/\mu$ l)	209,65(69,50)	222,35(41,87)	0,515	217,54(69,10)	214,61(54,22)	0,911
Homocisteína (μ g/ml)	15,88 (3,17)	15,96 (4,59)	0,958	15,55(3,30)	16,07(4,17)	0,727
Lp(a) (mg/dl)	40,62 (37,59)	43,84 (56,52)	0,842	44,90(38,37)	41,05(51,47)	0,826
Calcio (plasma)(mmol/l)	10,60 (3,30)	9,84 (0,40)	0,325	9,96(0,54)	10,34(2,82)	0,643
Calcio (orina)(mmol/l)	9,21 (7,07)	8,44 (7,92)	0,756	8,53(3,97)	8,96(8,62)	0,870
Fósforo (plasma)(mmol/l)	3,29 (0,47)	3,38 (0,36)	0,488	3,25(0,35)	3,25(0,35)	0,939
Fósforo (orina)(mmol/l)	56,83 (46,10)	39,66(23,37)	0,156	38,73(18,39)	52,63(42,7)	0,289
Vit. D (ng/ml)	38,37 (15,93)	28,30(14,83)	0,079	34,36(15,28)	32,23(16,48)	0,742
PTH (pg/ml)	66,54 (39,72)	73,20 (52,69)	0,674	68,52(42,65)	70,35(48,20)	0,915
OPG (pmol/L)	7,10 (2,37)	6,64 (1,80)	0,520	6,91(2,06)	6,81(2,09)	0,898
OPN (ng/ml)	14,15 (6,69)	15,30 (7,23)	0,623	14,28(6,68)	15,04(7,17)	0,757

*Incremento volumen pared arterial (disminución volumen bifurcación carotídea)>10%, respecto a basal.

** Incremento contenido de Ca>10%, respecto a basal.



Sin embargo, el análisis bivalente sí demostró una correlación estadísticamente significativa e inversa entre el contenido basal de Ca y progresión de estenosis volumétrica de la bifurcación ($r=-0,481$; $p<0,001$). En otras palabras, un menor contenido de Ca se asoció con una mayor tendencia a la progresión de la EA carotídea, estimada a través de la reducción en el volumen de la bifurcación (Fig. 4.8).

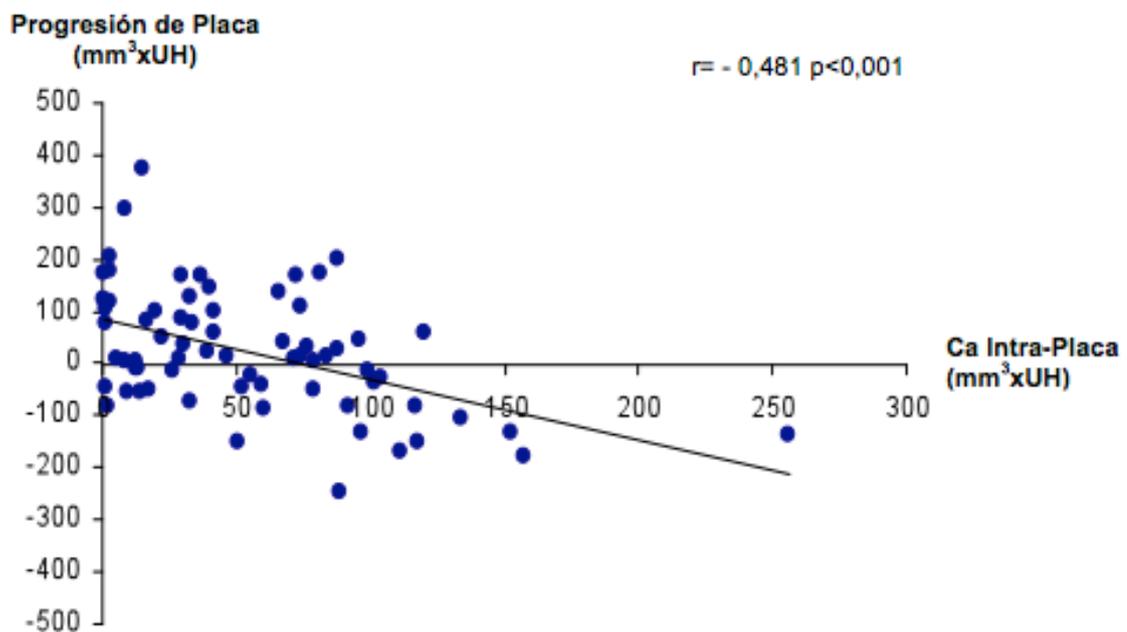


Figura 4.8 Regresión lineal simple entre la progresión de la placa AE (variación de la columna de contraste en la bifurcación carotídea a los 12 meses) y el contenido de Ca intraplaca en el estudio basal.

No se encontró relación, ya fuera en el análisis bivalente o multivariante, entre la presencia de lesiones isquémicas o lacunares en el parénquima cerebral ipsilateral en aquellas ECI > 50% y su tendencia a la progresión.

Así mismo nuestro estudio mostró una correlación positiva entre la progresión del contenido de Ca en la placa de ateroma y la Vit D ($r=0,406$, $p=0,029$).

El análisis de regresión múltiple permitió ajustar un modelo de regresión lineal entre la reducción del volumen de la bifurcación (progresión de AE carotídea) y el contenido basal de Ca intraplaca, ajustado por el IMC:

$$\Delta \text{volumen bifurcación} = 357,6 - (1,012 \times \text{Ca basal}) - (10,5 \times \text{IMC})$$

Dicha ecuación permitió predecir el 24,4% (R^2) de la variabilidad observada en la progresión de la AE carotídea.

El papel protector de la calcificación carotídea frente al desarrollo de sintomatología tromboembólica (objetivo 2.2.1.2 B) no pudo ser evaluado en el presente estudio por las razones expuestas y analizadas en la discusión. No obstante, dicha relación fue analizada en el estudio preliminar (estudio de casos y controles, es decir, pacientes sintomáticos y asintomáticos) y sus resultados aparecen reflejados al inicio de este apartado.



4.2.3 CALCIFICACIÓN ARTERIAL Y DESCALCIFICACIÓN ÓSEA. RELACIÓN ENTRE AMBOS PROCESOS

Se incluyeron 32 pacientes (30 hombres y 2 mujeres) en función de los criterios establecidos. El hecho de haber introducido la densitometría en el análisis a posteriori, modificando del protocolo inicial una vez iniciado el estudio, provocó una pérdida de 13 pacientes del grupo de análisis.

Todos los pacientes presentaban ECI=50-70% en el examen con eco-Doppler, 21 (65,62%) unilateral y 11 (34,38%) bilateral. En 2 pacientes las imágenes obtenidas en una de las 2 exploraciones de AngioTC presentaban artefactos que impidieron una correcta medición del contenido de Ca. En otro paciente con estenosis bilateral del 50-70% por eco-Doppler, una de las bifurcaciones presentaba oclusión en el examen mediante TC. Por tanto 30 pacientes (59 carótidas) quedaron disponibles para el análisis final.

Los datos demográficos, factores de riesgo, comorbilidad cardiovascular y tratamientos concomitantes aparecen reflejados en la Tabla 4.3, distribuidos en función de la detección o no de progresión en el contenido de Ca carotídeo. No se registraron diferencias significativas respecto a los pacientes sin progresión de sus calcificaciones. Los valores promedio y DE de los parámetros antropométricos, bioquímicos y del metabolismo Ca-P distribuidos en función de las variaciones del contenido de Ca de la bifurcación carotídea y de las variaciones de la densidad ósea del aparecen recogidos en las Tablas 4.4 y 4.5 respectivamente. No se registraron diferencias significativas respecto a los pacientes sin progresión del nivel de calcificación arterial. Sin embargo, el análisis de los parámetros correspondientes a los

pacientes que presentaron un aumento de la descalcificación ósea, reveló valores significativamente inferiores en el Z score de las densitometrías basales tanto a nivel del fémur como de columna lumbar. Así mismo, se observó una tendencia a la regresión del contenido de Ca en la bifurcación carotídea con un promedio de -5,6%, en comparación a un aumento del 26% en aquellos que presentaban mediciones estables o con aumento de la densidad ósea al final del periodo ($p=0,035$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.3

Datos demográficos, factores de riesgo vascular, comorbilidad cardiovascular y tratamientos concomitantes distribuidos en función de la progresión del contenido de Ca de la bifurcación carotídea.

Parámetro	n (%)	Progresión n (%)	P
Sexo (hombres)	28(93,33)	15(53,57)	0,483
Tabaquismo	18(60)	9(50)	0,645
Diabetes	11(36,67)	11(63,64)	0,520
Dislipemia	20(66,67)	11(50)	0,700
Hipertensión arterial	27(90)	14(51,85)	0,543
Cardiopatía isquémica	12(40)	8(66,67)	0,264
Isquemia extremidades (ITB<0,9)	25(83,33)	13(52)	0,624
Antiagregantes	29(96,67)	15(51,72)	0,309
Estatinas	23(76,67)	12(52,17)	0,666



Tabla 4.4

Valores promedio y desviación estándar (DE) de los parámetros antropométricos, bioquímicos y del metabolismo Ca-P y de su relación con la variación en el contenido de calcio de la bifurcación carotídea.

Parámetros	Estabil/Regres*	Progresión**	P
	n=15	n=15	
	<i>Promedio (DE)</i>	<i>Promedio (DE)</i>	
Edad	67,87(8,08)	67,27(7,96)	0,839
IMC	26,82(4,43)	27,39(2,46)	0,667
Perímetro de cintura	98,50(12,16)	105,40(10,14)	0,108
ITB menor	0,76(0,28)	0,73(0,22)	0,765
Creatinina (mmol/l)	0,97(0,24)	1,10(0,31)	0,227
Colesterol Total (mmol/l)	191,00(58,55)	174,14(35,92)	0,372
LDL colesterol (mmol/l)	87,89(35,08)	89,40(34,04)	0,925
HDL colesterol (mmol/l)	48,56(11,42)	55,80(8,55)	0,133
Triglicéridos (mmol/l)	141,15(43,75)	125,93(57,52)	0,449
Proteína C-reactiva (mg/dl)	7,42(8,50)	4,85(6,27)	0,396
Fibrinógeno (mg/l)	378,18(87,75)	370,61(62,02)	0,807
Homocisteína (µg/ml)	15,76(4,12)	15,76(3,44)	0,998
Lp(a) (mg/dl)	48,67(39,91)	42,94(59,44)	0,780
Calcio (plasma)(mmol/l)	9,93(0,49)	10,81(3,83)	0,417
Calcio (orina)(mmol/l)	169,36(116,69)	124,92(92,29)	0,274
Fósforo (plasma)(mmol/l)	3,36(0,41)	3,25(0,28)	0,416
Fósforo (orina)(mmol/l)	575,95(238,47)	710,31(331,03)	0,235
Vit. D (ng/ml)	35,22(13,14)	31,32(16,69)	0,563
PTH (pg/ml)	77,08(60,18)	67,31(43,24)	0,639
OPG (pmol/L)	6,99(2,11)	6,91(2,31)	0,936
OPN (ng/ml)	13,32(4,30)	15,40(6,67)	0,361
Z score fémur	0,053(0,88)	0,18(0,96)	0,709
Z score columna	0,13(1,37)	-0,19(1,92)	0,604
Δ Densidad ósea	-0,129(0,022)	-0,0043(0,014)	0,222

*Incremento del contenido de calcio en bifurcación carotídea <10%.

**Incremento del contenido de calcio en bifurcación carotídea ≥10%.

Tabla 4.5

Valores promedio y desviación estándar (DE) de los parámetros antropométricos, bioquímicos y del metabolismo Ca-P y de su relación con la variación en la densidad ósea.

Parámetros	Calcificación*	Descalcificación**	P
	n=17	n=13	
	<i>Promedio (DE)</i>	<i>Promedio (DE)</i>	
Edad	67,29(8,82)	67,92(6,81)	0,833
IMC	27,17(4,42)	27,01(2,03)	0,902
Perímetro de cintura (cm)	101,23(12,72)	103,25(9,94)	0,651
ITB menor	0,75(0,24)	0,75(0,27)	0,993
Creatinina (mmol/l)	1,07(0,26)	0,99(0,32)	0,533
Colesterol Total (mmol/l)	187,53(52,68)	173,30(39,63)	0,468
LDL colesterol (mmol/l)	91,43(35,53)	81,00(29,48)	0,566
HDL colesterol (mmol/l)	54,29(9,41)	47,00(12,28)	0,187
Triglicéridos (mmol/l)	134,52(51,88)	131,10(52,07)	0,870
Proteína C-reactiva (mg/dl)	5,56(6,49)	7,00(9,11)	0,650
Fibrinógeno (mg/l)	131,1(52,07)	367,00(71,46)	0,553
Homocisteína (µg/ml)	16,16(3,62)	14,92(3,89)	0,443
Lp(a) (mg/dl)	53,25(59,63)	31,09(22,01)	0,296
Calcio (plasma)(mmol/l)	10,71(3,46)	9,84(0,45)	0,439
Calcio (orina)(mmol/l)	125,18(104,84)	181,09(102,38)	0,176
Fósforo (plasma)(mmol/l)	3,33(0,34)	3,25(0,38)	0,549
Fósforo (orina)(mmol/l)	689,88(272,4)	569,02(311,08)	0,295
Vit. D (ng/ml)	34,38(15,96)	30,18(12,48)	0,572
PTH (pg/ml)	80,43(55,32)	59,03(44,47)	0,313
OPG (pmol/L)	6,61(2,13)	7,26(2,16)	0,456
OPN (ng/ml)	15,13(7,07)	15,12(6,54)	0,999
Z score fémur	0,43(0,75)	-0,29(0,95)	0,028
Z score columna	0,56(1,52)	-0,79(1,53)	0,023
Δ Calcio carotídeo	0,26(0,36)	-0,06(0,32)	0,035

*Estabilidad o aumento de la densidad ósea respecto a la densitometría basal.

** Disminución de la densidad ósea respecto a la densitometría basal.

Las determinaciones del contenido de Ca intra-placa a partir de su estimación mediante ASm (volumen total x densidad radiológica promedio [UH]) reveló un aumento del Ca intraplaca respecto a los valores basales (79,2 [55] vs 64,68 [49,2] mm³xUH, p=0,12) (Fig. 4.9 A).

En base a los parámetros de referencia considerados, 10 (31.25%) pacientes presentaban osteopenia en la densitometría ósea basal y 2 (6.25%) criterios de osteoporosis.

El análisis densitométrico a nivel de columna y fémur, demostró, a los 12 ± 2 meses, una disminución significativa de la densidad ósea respecto a la determinación basal en el promedio de ambas localizaciones ($2,06 [0,23]$ vs $2,08 [0,22]$ g/cm^2 ; $p=0,013$) (Fig. 4.9 B).

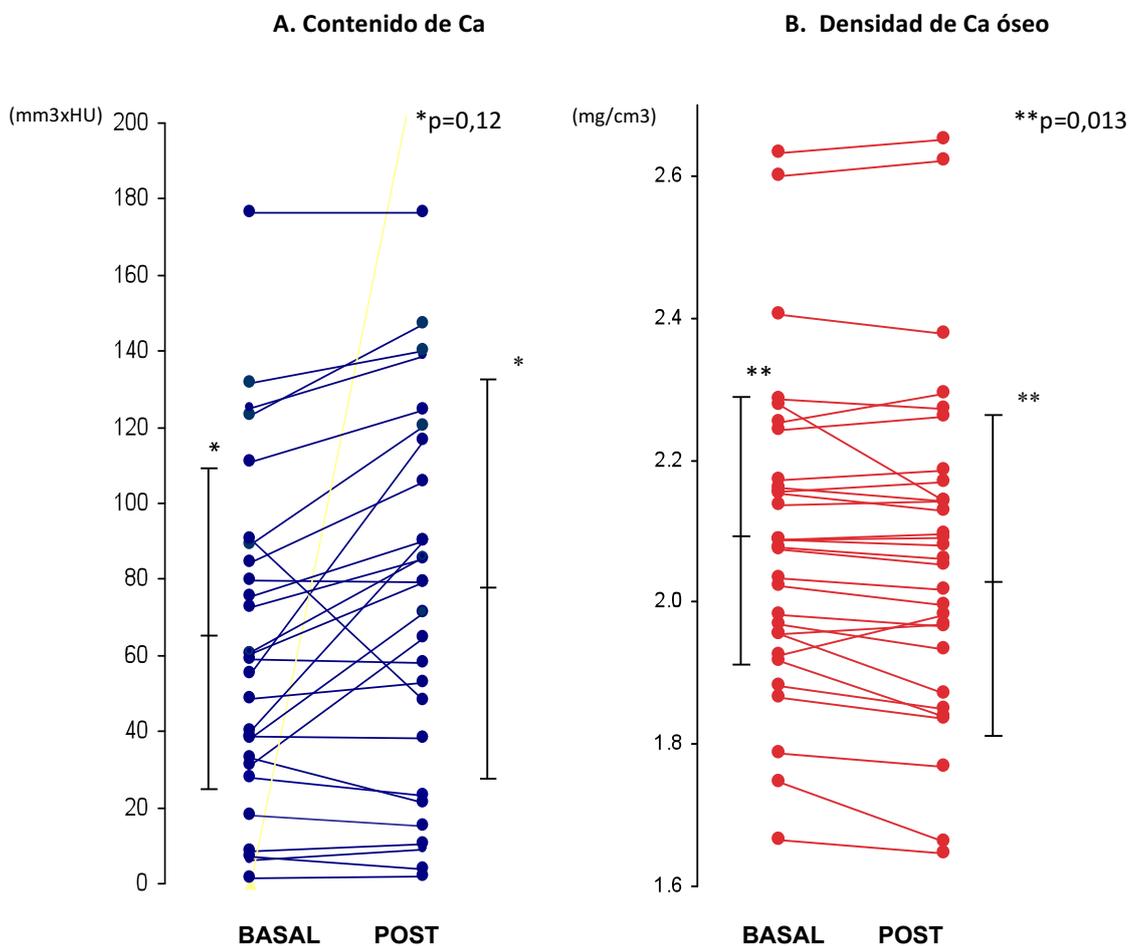


Figura 4.9 Variación cuantitativa, basal y al final del período de seguimiento, del contenido de Ca intraplaca en AngioTC (A) y de la densidad de calcio óseo en densitometría (B).

En el análisis univariable, se identificó una correlación significativa entre el incremento relativo del contenido de Ca (incremento absoluto dividido por el valor basal) y la variación en la densidad ósea entre las determinación basal y la del final del seguimiento ($r=0,574$, $p=0,003$). En otras palabras, una mayor tendencia a la osteoporosis se asoció con una menor tendencia a la progresión del calcio intraplaca (Fig. 4.10).

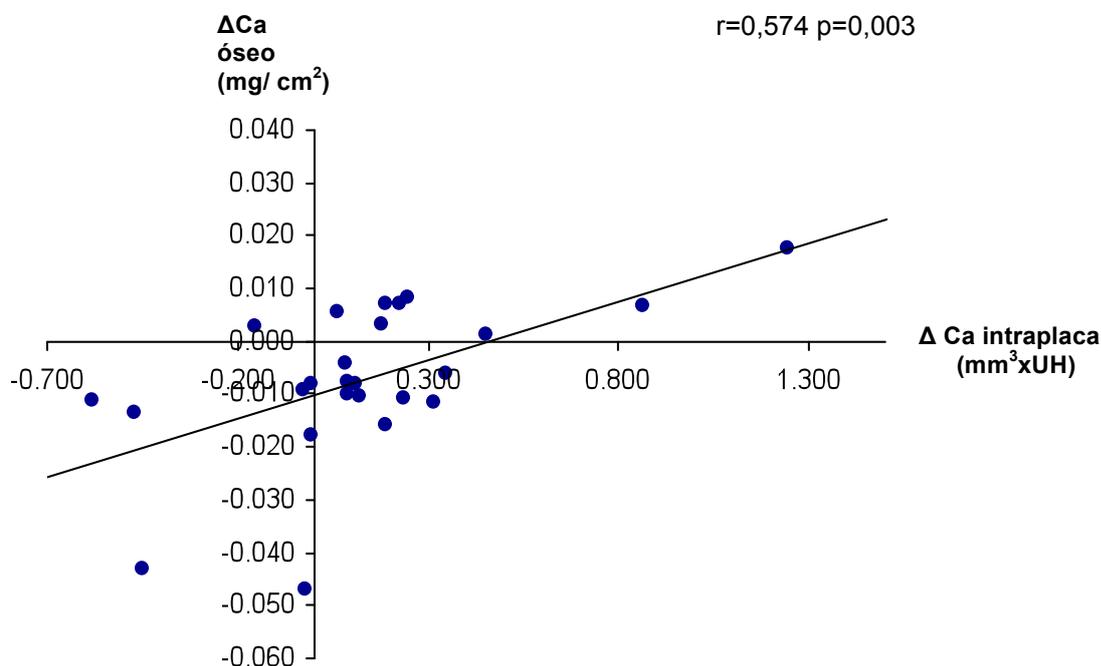


Figura 4.10 Regresión lineal simple entre la variación de la densidad de Ca óseo (promedio densitométrico en fémur y columna) en determinación basal y a los 12+/-2 meses y la variación en el contenido de Ca intraplaca (bifurcación carotídea en AngioTC basal y al final del período de seguimiento).

Otras relaciones de interés fueron la asociación entre los niveles plasmáticos de Vit D y la densitometría basal ($r=-0,459$, $p=0,036$), así como entre los niveles plasmáticos de HDL-colesterol y la disminución relativa, respecto a los valores basales, de la densidad ósea ($r=-0,579$, $p=0,009$). Sólo la concentración de P en orina presentó una correlación positiva moderada con el aumento de Ca intra-placa ($r= 0,488$, $p=0,015$).



Ninguna otra variable, entre los parámetros del metabolismo Ca-P, mostró relación con la calcificación arterial.

Además, se halló una correlación positiva entre la progresión del contenido de Ca en la placa de ateroma y los niveles plasmáticos de vit D ($r=0,4$; $p=0,025$) y densitometría ósea basal (score Z en fémur) ($r=0,378$; $p=0,047$).

Otras relaciones de interés fueron la asociación entre la densitometría ósea basal (promedio de densidad ósea absoluta en fémur y columna) y los niveles plasmáticos de triglicéridos ($r=0,37$; $p=0,016$) y proteína C reactiva ($r=0,403$; $p=0,011$).

No se observó relación entre la concentración de OPG y OPN en suero y el contenido de Ca inicial ni con la progresión de la calcificación de la placa (Tabla 4.4).

Tampoco se apreció relación entre la concentración de OPG y OPN en suero y el contenido de Ca óseo inicial (densitometría basal) ni con la progresión de la descalcificación ósea (Tabla 4.5). Sí encontramos una correlación positiva entre OPG y parámetros del metabolismo óseo como PTH ($r=0,453$; $p=0,009$) y homocisteína ($r=0,478$; $p=0,006$).

El análisis de regresión múltiple permitió ajustar un modelo lineal con relación directa entre la variación en el contenido de Ca intraplaca (ΔCa intraplaca, AngioTC) y en la densidad ósea (ΔCa óseo, densitometría), ajustado por la concentración de P en orina, a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta Ca \text{ intraplaca} = 0,65 + 11,4 \Delta Ca \text{ óseo} + 0,004 P \text{ orina}$$

El análisis de residuales mostró un ajuste adecuado del modelo. Dicha ecuación de regresión permitió explicar el 62% (R^2) de la variabilidad observada.

4.2.4 ANÁLISIS GENÉTICO (POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA OPG) Y PROGRESIÓN DE LA CALCIFICACIÓN EN LA PLACA DE ATEROMA

Inicialmente se compararon las distribuciones de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del gen de la OPN en nuestro grupo control (sujetos sanos) frente a las publicadas en las bases de datos para la población general caucásica ($p > 0,05$, datos no mostrados), sin encontrarse diferencias entre ambos grupos. Por otro lado, se comparó la distribución genotípica de cada SNP, obtenida para los 92 voluntarios sanos y para los 48 pacientes con calcificación de la placa de ateroma (Tabla 4.6). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) y los distintos polimorfismos se muestran distribuidos de igual modo en pacientes y en controles (rs3134071, rs3134070 y rs3134069: $p = 0,494$; rs7844539: $p = 0,484$; rs3102735: $p = 0,351$; rs2073618: $p = 0,911$ y rs2073617: $p = 0,643$).

Los valores obtenidos para la concentración de OPG en el suero oscilaron entre 3,57 y 11,3 pmol/L encontrándose su mediana en 6,16 pmol/L. A pesar de la variación en los valores, no encontramos relación estadísticamente significativa entre la distribución de ninguno de los 7 polimorfismos estudiados y la concentración de OPG en suero ($p > 0,05$) (Tabla 4.7).



Tabla 4.6

Distribución genotípica de los SNPs del gen que codifica la OPG en voluntarios sanos (n=92)⁽¹⁾ y en los pacientes del estudio (n=48)⁽²⁾.

Polimorfismo nomenclatura NCBI	Nombre alternativo	Sujetos de estudio	Genotipo			P
			CC	CT	TT	
Rs2073617	T950C	Voluntarios sanos ⁽¹⁾ % (N)	26,1 (24)	46,7 (43)	27,2 (25)	0,643
		Pacientes ⁽²⁾ % (N)	22,9 (11)	43,7 (21)	33,3 (16)	
Rs2073618	G1181C	Voluntarios sanos % (N)	29,3 (27)	46,7 (43)	23,9 (22)	0,911
		Pacientes % (N)	31,3 (15)	43,7 (21)	25,0 (12)	
Rs3102735	A163G	Voluntarios sanos % (N)	1,1 (1)	9,8 (9)	89,1 (82)	0,351
		Pacientes % (N)	0 (0)	14,6 (7)	85,4 (41)	
Rs7844539	A6890C	Voluntarios sanos % (N)	1,1 (1)	8,7 (8)	90,2 (83)	0,484
		Pacientes % (N)	0 (0)	12,5 (6)	87,5 (42)	
Rs3134069	T245G	Voluntarios sanos % (N)	89,1 (82)	9,8 (9)	1,1 (1)	0,494
		Pacientes % (N)	95,8 (46)	8,2 (2)	0 (0)	
Rs3134070	G209A	Voluntarios sanos % (N)	89,1 (82)	9,8 (9)	1,1 (1)	0,494
		Pacientes % (N)	95,8 (46)	8,2 (2)	0 (0)	
Rs3134071	T149C	Voluntarios sanos % (N)	89,1 (82)	9,8 (9)	1,1 (1)	0,494
		Pacientes % (N)	95,8 (46)	8,2 (2)	0 (0)	

Tabla 4.7

Distribución genotípica de los polimorfismos estudiados en función de la concentración de OPG en suero.

SNP	GENOTIPO	N	Pacientes con [OPG]>6,16 pmol/L ⁽¹⁾ N(%)	Pacientes con [OPG]≤6,16 pmol/L N(%)	p
T245G/G209A/T149C	TT/GG/TT	44	22 (50)	22(50)	0,166
	TG/GA/TC	2	2(100)	0 (0)	
	GG/AA/CC	0	0(0)	0(0)	
A6890C	CC	0	0(0)	0(0)	0,187
	AC	5	4(80)	1(20)	
	AA	41	20(49)	21(51)	
A163G	GG	0	0(0)	0(0)	0,446
	AG	6	4(67)	2(33)	
	AA	20	20(50)	20(50)	
G1181C	GG	15	6(40)	9(60)	0,248
	CG	20	10(50)	10(50)	
	CC	11	8(73)	3(27)	
T950C	TT	11	8(73)	3(27)	0,197
	TC	19	10(53)	9(47)	
	CC	16	6(37)	10(63)	

⁽¹⁾ Mediana de los valores de concentración de OPG obtenidos en suero



5. DISCUSIÓN

El aparente papel protector de la presencia de Ca en la placa de ateroma frente al desarrollo de sintomatología tromboembólica proviene de estudios histopatológicos que demuestran un menor contenido de Ca en las muestras de placa carotídea de pacientes sintomáticos⁽²¹⁸⁾. Esta evidencia se ha visto posteriormente reforzada por el análisis del grado de calcificación carotídea con eco-Doppler, y más recientemente, mediante AngioTC, en series de pacientes sintomáticos y asintomáticos^(5, 204, 226).

En un metanálisis que incluía 24 estudios, en los que se valoraban diferentes métodos para identificar y cuantificar la calcificación de la placa carotídea, la evaluación global de los resultados demostró una correlación inversa ($r=-0,425$) entre el contenido de Ca y la presencia de sintomatología neurológica ipsilateral a la estenosis⁽²²¹⁾, lo que nos haría pensar en un posible papel estabilizador del Ca en la aterosclerosis carotídea. En nuestro estudio, las placas con mayor contenido cálcico presentaban una menor tendencia a la progresión, medida a través de la estenosis volumétrica, es decir, permanecieron más estables. Sin embargo, por las características del estudio, no pudimos asociar esta estabilidad morfológica con la clínica, pues recordemos que los pacientes eran asintomáticos y hubiera sido necesario un tamaño muestral y tiempo de seguimiento mayores de la población estudiada.



5.1 ESTUDIO PILOTO

Cuantificación y caracterización del calcio carotídeo con AngioTC en pacientes neurológicamente sintomáticos y asintomáticos.

La relación entre calcificación y clínica neurológica se estableció en el estudio piloto, anterior a este trabajo⁽⁵⁾. En él, los pacientes asintomáticos tenían un contenido de Ca en la placa carotídea significativamente mayor que los sintomáticos (ASm: $122,6 \pm 138,0 \text{ mm}^3 \times \text{HU}$ vs $42,8 \pm 59,1 \text{ mm}^3 \times \text{HU}$, $p < 0,05$) y las placas calcificadas, con una localización de predominio en la superficie luminal, tuvieron 12 veces menos probabilidad de ser sintomáticas. Por el contrario, un menor contenido de Ca en las placas carotídeas, así como una distribución en la base de la lesión, se asociaba con una mayor prevalencia de síntomas neurológicos. Ninguna otra variable independiente (datos demográficos, clínicos o de laboratorio) fue predictiva de los síntomas neurológicos. Esto sugiere nuevamente el papel potencial del Ca como marcador del riesgo de accidente cerebrovascular, quizá con un papel más importante, incluso, que los factores de riesgo clásicos para la predicción de eventos cardiovasculares.

5.2 ESTUDIO ACTUAL

Cuantificación del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante AngioTC: perfil evolutivo y relación con la progresión del grado de estenosis volumétrica

5.2.1 MEDICIÓN VOLUMÉTRICA DE LA BIFURCACIÓN CAROTÍDEA. CONCEPTO ALTERNATIVO A LA GRADACIÓN DE LA ESTENOSIS

El desarrollo de placas de ateroma que sobresalen en el interior de la luz arterial es el principal efecto asociado con la enfermedad aterosclerótica. La mayoría de los métodos utilizados tradicionalmente para su cuantificación se han basado en la cuantificación de la reducción del diámetro de la luz arterial, expresado como el porcentaje de luz residual en comparación con un valor teóricamente normal (estenosis morfológica). Este sistema se ha utilizado de forma persistente en la angiografía convencional y, recientemente, a partir de reconstrucciones 2D obtenidas con AngioTC o AngioRM. La precisión en la estimación del grado de ECI, dependerá de la resolución espacial del método diagnóstico elegido.

Además, la medición biplanar requiere la selección de un segmento vascular normal de referencia que no siempre es fácilmente objetivable. La falta de unanimidad al respecto ha motivado la aparición de distintos sistemas de medición de la ECI, entre los que destacan los utilizados en los estudios epidemiológicos NASCET y ECST⁽²⁴⁰⁾ sobre los que se basa la mayor parte del conocimiento actual sobre la historia natural de la endarterectomía carotídea en pacientes sintomáticos. La principal diferencia entre ambos métodos estriba en el denominador elegido para el cálculo del porcentaje de estenosis: el límite externo teórico del bulbo carotídeo (ECST) o la luz vascular inmediatamente por encima de la estenosis (NASCET). En la práctica, la estimación del



grado de estenosis tiende a una sobreestimación con el primer sistema respecto al del NASCET⁽²⁴¹⁾.

Sin embargo, la medición biplanar del grado de estenosis tiene ciertas limitaciones: subestima la carga de placa en estenosis moderadas, no tiene en cuenta su crecimiento excéntrico, y presenta una correlación interobservador que oscila entre 0,61-0,9 para la angiografía, y de hasta 0,85 y 0,89 para la AngioTC y la RM respectivamente⁽²⁴²⁻²⁴⁴⁾.

La introducción de los avances en el post-proceso y análisis de las imágenes⁽²⁴⁵⁾, el análisis densitométrico y el cálculo automatizado del porcentaje de estenosis han mejorado ligeramente la precisión diagnóstica. No obstante, el propio fundamento del sistema de medición: colapso bidimensional de las estructuras vasculares cilíndricas, impone grandes inconvenientes físicos.

Alternativamente, es posible la estimación directa del grado de estenosis a partir de las turbulencias o aceleración del flujo vascular por efecto de la estenosis (estenosis hemodinámica). Esta es la base teórica de la medición mediante eco-Doppler. A pesar de su buena resolución espacial (0,15-0,6mm)⁽²⁴⁶⁾, el principal inconveniente de este método es su alta subjetividad operador dependiente, con una correlación interobservador que oscila entre 0,68 y 0,92⁽²⁴⁷⁾. Además, sólo permite una gradación categórica de la estenosis. Clásicamente: 0-30%, 31-50%, 51-70% y 71-99%.

El grado de ECI ha sido, hasta ahora, el único criterio con suficiente consistencia para estimar el riesgo de AVC, en pacientes asintomáticos o nuevos episodios en pacientes previamente sintomáticos. Sin embargo, este riesgo solo es atribuible a ECI >60-70% en alrededor de la mitad de los casos. Revisiones posteriores de los grandes estudios epidemiológicos anteriormente mencionados (ECST, NASCET)⁽²⁴⁸⁾ han

sugerido la indicación profiláctica de la endarterectomía carotídea en ECI >50% en pacientes con bajo riesgo quirúrgico. Sin embargo, el papel de estenosis moderadas (ECI= 30-50% en pacientes sintomáticos, ECI=50-70% en los asintomáticos) sigue sin estar aclarado.

Es probable que uno de los motivos de esta indefinición sea que la medición del grado de ECI resulta en realidad insuficiente para evaluar el potencial embolígeno de la aterosclerosis carotídea. Tal vez, en un futuro próximo, sea necesario reevaluar la historia natural de la enfermedad carotídea con otros sistemas de medición más centrados en la valoración de la carga neta de placa de ateroma y sus características histológicas. Recientemente, los sistemas de software para la reconstrucción de imágenes 3D a partir de cortes transversales de AngioTC y RM y, especialmente, la disminución de intervalos y solapamientos entre los mismos ha permitido reducir su espesor y mejorar su resolución espacial (hasta 0,25 mm con la TC multidetector de 256 cortes)⁽¹⁷⁶⁾.

Por otra parte, la evolución del software de post-proceso permite implementar múltiples mediciones geométricas tanto transversales, a partir de proyecciones MIP, multiplanares (MPR) y curvadas (CPR) de la luz vascular, como volumétricas de la placa de ateroma y la codificación de sus componentes en función de rangos de densidad radiológica en UH. La aplicación y precisión de estos sistemas de medición se ha ensayado en diversos sectores, incluyendo el coronario⁽²⁴⁹⁾ y el carotídeo^(250, 251).

En este estudio, la estimación indirecta del volumen de placa en general, o carga de placa, se basó en su "efecto de masa" o reducción del volumen del molde de contraste comprendido entre dos límites estandarizados (2 cm por debajo y 1 cm por encima de la bifurcación de la carótida)⁽²⁵²⁾.

Las ventajas teóricas aportadas por la medición volumétrica de la bifurcación carotídea con AngioTC y RM se basan en la posibilidad de cuantificar indirectamente la carga de placa. Además, permiten identificar su crecimiento excéntrico y su caracterización con una elevada concordancia intra e interobservador^(253, 254).

En este estudio, la determinación volumétrica de la estenosis carotídea con AngioTC mostró una buena correlación intra e interobservador (CCI=0,962 y 0,937, respectivamente). Por otra parte, la estimación del grado de reducción del diámetro arterial a partir de su impacto en el volumen total ($V = \pi R^2 \times h$, siendo R= radio y h= altura) permite detectar pequeñas variaciones con mayor precisión que su medición directa. Considerando la bifurcación carotídea como una estructura cilíndrica homogénea, una variación en su diámetro del 10% se transforma en una variación del volumen del 19%. Asumiendo una variabilidad intraobservador <5%, es posible apreciar dicha variación con una precisión relativa <2,75%⁽²⁵²⁾ (Fig. 5.1).

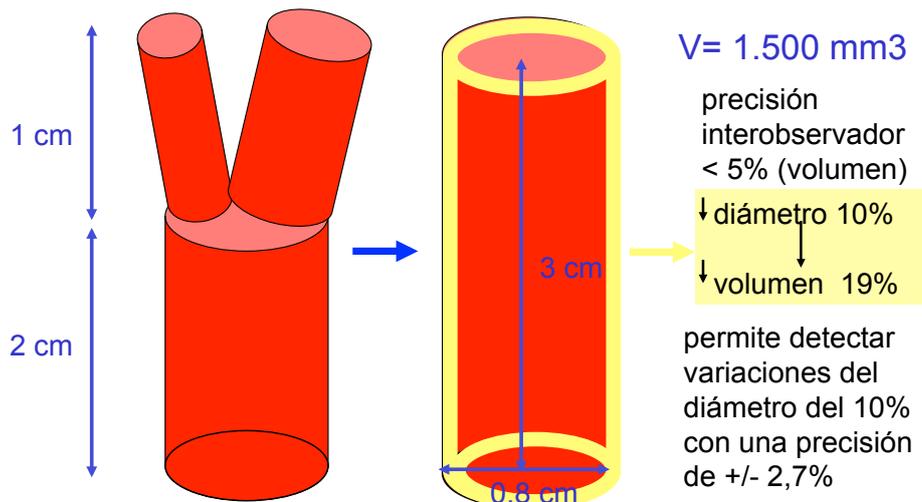


Figura 5.1 Estimación del grado de reducción del diámetro arterial a partir de su impacto en el volumen total a partir de la modelización geométrica de la bifurcación carotídea.

La comparación de los resultados obtenidos de la medición volumétrica con AngioTC, respecto a la determinación del grado de estenosis máxima (AngioTC 2D MIP) permitió estimar el punto de corte óptimo (cociente VBif/VCP=4,1) para identificar ECI>50%. No obstante, la precisión de la medición volumétrica de la ateromatosis carotídea con AngioTC, en comparación a la estimación a partir del grado de estenosis máxima, fue solo moderada (Sens=0,75%, Esp=0,75). Un análisis detallado de los casos reveló una elevada tasa de falsos positivos y negativos como consecuencia de los casos con reducción o aumento homogéneo del volumen de la bifurcación, pero sin estenosis focal significativa desde el punto de vista hemodinámico. Estos resultados deben contemplarse desde una perspectiva adecuada. Probablemente reflejan distintos sistemas de medición: estenosis máxima (eco-Doppler y AngioTC 2D MIP) y disminución global del volumen de la bifurcación carotídea debido a la hiperplasia de la íntima y a la carga neta de placa sobre la superficie interior de la pared del vaso (medición volumétrica con AngioTC). Observaciones similares se han descrito por otros autores. Rozie y cols.⁽²⁵⁰⁾ valoraron las AngioTC de 57 bifurcaciones carotídeas obteniendo una correlación moderada ($r=0,66$) entre el grado de estenosis y el volumen total de la placa, haciendo hincapié una vez más en que ambos conceptos no están necesariamente relacionados.

Por otra parte, el análisis de progresión/regresión de la placa de ateroma se ha visto limitado por la falta de un sistema de medición suficientemente preciso y reproducible. La medición ecográfica del espesor íntima-media (IMT) se ha utilizado con profusión, e incorporado al software de la mayor parte de equipos de ecografía de gama media y alta. Sin embargo, sus limitaciones son evidentes debido a las dificultades para establecer referencias anatómicas estables lo que obliga en la



práctica a realizar múltiples mediciones. A esto, se añaden las limitaciones físicas para detectar pequeñas variaciones del IMT en el límite de resolución de la imagen ecográfica, necesitando realizar múltiples determinaciones en diferentes proyecciones biplanares⁽²⁵⁵⁾. Más recientemente, la introducción de transductores volumétricos automatizados con exploración secuencial (3D y 3D en tiempo real [4D]) han permitido su uso en estudios de progresión/regresión, ya sea con o sin intervención farmacológica^(176, 256).

El seguimiento de la evolución de las lesiones con la AngioCT ofrece ventajas teóricas en comparación con volumetría con eco-Doppler: menor subjetividad y menos interferencias causadas por artefactos de imagen, especialmente del calcio intraplaca⁽²⁵⁷⁾.

En este estudio, el seguimiento a los 12 meses identificó una progresión significativa en 32 ECI respecto al valor basal. En 24 casos la medición permaneció estable y en 27 se observó regresión. No obstante, estos resultados deben contemplarse con precaución ya que su efecto puede atribuirse a una remodelación de la bifurcación más que a una reducción neta de la carga de placa. Además, 28 (64,4%) pacientes se encontraban en tratamiento con estatinas, cuyo impacto sobre la remodelación de la pared arterial, derivado de sus efectos hipolipemiente y pleiotrópicos ha sido ampliamente analizado⁽²⁵⁸⁾.

Las principales limitaciones de este estudio están relacionadas con los inconvenientes impuestos por el propio sistema de medición: artefactos por contacto con el calcio de pared o definición del límite de la columna de contraste en función de su densidad radiológica. Aunque, el volumen de las calcificaciones se sustrajo de la imagen final y las mediciones estandarizadas mediante su cociente con un segmento

de CP libre de placa, son necesarios nuevos algoritmos que permitan mejorar la precisión de las mediciones y su ejecución automatizada.

En conclusión, la medición volumétrica de la ateromatosis carotídea supone un nuevo concepto basado en la variación del volumen de la bifurcación carotídea por efecto de la carga neta de placa, más que en su efecto hemodinámico o estenosis máxima. Su distinto fundamento justificaría una concordancia con el eco-Doppler tan solo moderada, a pesar de la elevada concordancia intra e interobservador. Dada su precisión en la detección de variaciones pequeñas del diámetro arterial, este método puede ser de especial utilidad en estudios de progresión/regresión de la ateromatosis carotídea.



5.2.2 DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRAPLACA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA

La mayoría de las series que analizan mediante AngioTC el contenido de Ca en la pared vascular emplean el *Agtaston score* (AS) o cualquiera de sus variantes. Inicialmente fue descrito para medir el área de calcificación en cortes transversales obtenidos en la TC por haz de electrones, pero el AS nos permite no sólo estimar el contenido de Ca a partir del producto de esta zona, aislada después de aplicar un umbral para la detección del calcio (130 HU), sino también su densidad radiológica promedio⁽²⁵⁹⁾. El *volumen score* es una modificación del primero, basado en reconstrucciones volumétricas filtradas con los mismos parámetros de densidad radiológica. No obstante, algunos autores han advertido sobre la falta de linealidad y una tendencia a sobreestimar las mediciones por el efecto de volumen parcial⁽²⁶⁰⁾. Este artefacto consiste en un error en la medición del volumen de las estructuras radiológicas como resultado de la asignación de un *voxel* a pesar de su localización parcial en los límites periféricos de la imagen. Por esta razón, y con el fin de lograr una estimación más precisa, se recomienda el uso del *mass score*, que se obtendría mediante la calibración de la TC utilizando muestras con concentraciones conocidas de hidroxapatita⁽²⁶¹⁾.

En este estudio, hemos utilizado el ASm con imágenes 3D (*volumen score*) para cuantificar el contenido de Ca. Sin embargo, con el fin de optimizar las mediciones, no fijamos un umbral UH preestablecido, pues la selección de la placa se asociaba a una heterogeneidad de atenuaciones que requería un ajuste manual para delimitar con mayor precisión el contorno de la calcificación en cada bifurcación.

La posibilidad de medir de forma no invasiva los depósitos de calcio en la pared arterial mediante AngioTC ha favorecido la inclusión de este parámetro en las ecuaciones de predicción del riesgo coronario. El desarrollo de software basado en este enfoque (p.e. Smartscore; GE Medical Systems) ha aumentado en los últimos años. Kondos y cols.⁽²¹³⁾, después de 37 meses de seguimiento a 5635 pacientes asintomáticos, encontraron que los pacientes que mostraban estados de calcificación más avanzados (cuartil superior) presentaban un riesgo dos veces superior de sufrir accidentes isquémicos coronarios. Los resultados recogidos en éste y en otros estudios revelan un aumento paradójico de riesgo coronario^(262, 263) y de AVC⁽²¹⁶⁾ proporcional a la intensidad de la calcificación, que parecen contradecir la hipótesis del papel protector desempeñado por el calcio intraplaca en la evolución de las lesiones AE. Sin embargo, este efecto podría explicarse, al menos en parte, por la propia base de la estrategia en la que se fundamenta: estimación global de la severidad de las lesiones, en función de su relación lineal con el contenido de Ca de la pared arterial⁽²⁶⁴⁾.

La evolución temporal del proceso de calcificación y su uso clínico apenas ha sido analizado. La tasa de progresión anual de la calcificación coronaria en individuos con riesgo cardiovascular intermedio, en la escala de Framingham, basada en las estimaciones obtenidas con el AS y el *volumen score*, oscilaría entre el 20% y el 25%⁽²⁶⁵⁾.

Al contrario de lo que ocurre con la determinación de Ca en las arterias coronarias, reconocido marcador de riesgo cardiovascular, existen pocos estudios prospectivos que estudien la evolución del Ca en la placa carotídea. Van Gils y cols.⁽²⁶⁶⁾ publicaron recientemente el único estudio que existe hasta la fecha, en el que se valoraba la progresión del Ca en la placa carotídea mediante AngioTC en una población de 224



pacientes, todos ellos sintomáticos desde el punto de vista neurológico, con un seguimiento medio de 4,7 años. Sesenta y siete placas no presentaban calcificación al inicio del estudio, y durante el seguimiento, 27 de ellas se calcificaron, asociándose edad e HTA al proceso. De las 155 placas con calcificación al inicio del estudio, 150 progresaron (rango $0,03 \text{ mm}^3$ hasta $37,4 \text{ mm}^3$). El crecimiento anual medio fue de $2,2 \text{ mm}^3$. Cuatro placas presentaron regresión en el contenido de Ca. Sus resultados destacan la asociación entre FRCVs (edad, niveles de glucemia, HTA y tabaquismo) y el crecimiento anual de la calcificación, pero es la carga previa de Ca de la placa, el predictor más importante para el crecimiento absoluto de la calcificación. En los pacientes que presentaron recurrencia de los síntomas neurológicos ($n=37$), no se encontraron diferencias respecto al volumen de Ca o al crecimiento del mismo. Estos autores encontraron, para el total de pacientes, un incremento anual medio de volumen de calcio del 31%. Nuestro estudio, por el contrario, muestra una progresión anual del 9% en el contenido de Ca en relación a las cifras basales.

Así mismo, nuestros datos revelan una progresión neta de la estenosis volumétrica del 9,5% si se compara con los valores basales. De hecho, 29 (37,2%) bifurcaciones carotídeas presentaron un incremento del volumen de la pared $>10\%$ respecto al valor basal. Dicho proceso presentó una relación lineal inversa respecto al grado de calcificación de la pared arterial al comienzo del estudio. Estos resultados sugieren intensamente el efecto protector del Ca intraplaca frente a la progresión de la AE carotídea y, por lo tanto, su estabilización frente al riesgo subsiguiente de generar procesos tromboembólicos como consecuencia de su degeneración.

Entre las comorbilidades y factores de riesgo vascular analizados en este estudio, sólo la hipertensión y la diabetes mostraron una mayor prevalencia entre los pacientes

en los que se detectó progresión AE en el promedio de ambas bifurcaciones carotídeas. Existen diferentes estudios en los que se estudia la calcificación coronaria y su relación con los FRCVs. En estos estudios la edad y la HTA, aparecen como factores de riesgo responsables de la incidencia de calcificación detectable^(262, 267). Kronmal y cols.⁽²⁶²⁾, en un estudio prospectivo sobre una población multiétnica de 2807 individuos, observaron una progresión de la calcificación coronaria de base asociada al IMC, diabetes mellitus, HTA e historia familiar previa de infarto de miocardio y una vez ajustado a la carga inicial de calcio.

Por otra parte, la existencia de 22 (28,0%) bifurcaciones carotídeas en el que se registró una disminución neta del volumen de la pared arterial debe contemplarse con cautela. Aunque en parte podría atribuirse a un efecto de regresión de la placa AE, dado el carácter volumétrico de las mediciones, sería mucho más adecuado hablar de remodelación global de la bifurcación carotídea. Es de destacar que 28 (64,4%) pacientes estaban en tratamiento con estatinas, cuyo impacto sobre el proceso de remodelación arterial a través de los efectos pleiotrópicos de las estatinas se ha observado en estudios previos⁽²⁵⁸⁾.

Las principales limitaciones de esta parte del estudio están relacionadas con las limitaciones intrínsecas al propio método de medición:

1. Límite de resolución del AngioTC condicionado por las dimensiones mínimas del *voxel* generado en la reconstrucción 3D (0,7x 0,8 mm x 1mm).
2. Efecto “volumen parcial”: error en la medición del volumen de estructuras radiológicas como consecuencia de la asignación de un *voxel* a pesar de su ocupación parcial en los límites periféricos de la imagen.



3. Solapamiento de densidad entre contraste intravascular y calcificación que dificulta la detección de calcificaciones de baja densidad. Se ha sugerido un umbral de atenuación de TC de 130 HU para discriminar el Ca de los tejidos circundantes. Sin embargo, este límite puede resultar demasiado bajo en presencia de un agente de contraste. Esta característica ha sido analizada específicamente por diversos autores. La caracterización de la placa aterosclerótica con AngioTC reveló que el calcio se reconoce con un valor de atenuación por encima de 220 HU⁽²⁰⁹⁾, mientras que el contraste intraluminal requirió fijar el umbral entre 118 y 326 HU⁽²⁶⁸⁾ y el tejido fibroso y los lípidos se identificaron a 30-150 HU y por debajo de 30 HU, respectivamente⁽²⁶⁹⁾. En el presente estudio se consideró que un umbral de discriminación de 420 UH diferenciaba las calcificaciones del contraste intravascular. Por contra, este alto límite puede llevar a subestimar los volúmenes de calcificación verdaderos.

4. La medición volumétrica del contenido de Ca, y no de la masa de calcio, asumiendo un modelo lineal de la relación en las variaciones del contenido de Ca.

5. Por último, debido al propio diseño del estudio, no fue posible relacionar los cambios volumétricos de la placa y su contenido de Ca, con la progresión de la clínica neurológica.

A pesar de estas limitaciones, sus resultados, especialmente el perfil temporal de la evolución de las lesiones, sugieren una relación causa-efecto entre su progresión y el contenido de calcio intraplaca.

5.2.3 CALCIFICACIÓN ARTERIAL Y DESCALCIFICACIÓN ÓSEA. RELACIÓN ENTRE AMBOS PROCESOS

El proceso de calcificación arterial ha suscitado especial interés en los últimos años. Su paralelismo con los mecanismos de mineralización ósea esquelética es evidente. Sin embargo, su origen y relación permanecen inciertos.

Se ha sugerido que las áreas de calcificación intraplaca son una secuela o señal de fenómenos inflamatorios previos. Los estudios histológicos demuestran la co-localización de macrófagos y linfocitos-T con los depósitos de calcio⁽²⁷⁰⁾. Estas células inflamatorias secretan citoquinas y factores de crecimiento y diferenciación que, por mecanismos aun no bien conocidos, estimulan la expresión de proteínas de matriz asociadas al metabolismo óseo (osteocalcina, osteonectina, OPN, OPG, sialoproteína, MGP, o BMP-2). De hecho, se ha comprobado, mediante técnicas de inmunohistoquímica, un aumento de la expresión de mRNA de algunas de estas proteínas en las regiones calcificadas⁽²⁷¹⁾. Además, son responsables de que las CMLs adopten un fenotipo osteogénico, transformándose en las que se han denominado células calcificantes vasculares (CVCs), las cuales expresan también proteína S-100 ligadora de calcio⁽²⁷²⁾ y están localizadas en áreas de calcificación. Por otra parte, cualquier mecanismo que aumente la concentración local de calcio y fósforo, tales como la muerte celular o el propio fenómeno inflamatorio favorecerán su deposición. Estos iones encuentran en las vesículas apoptóticas y en los ésteres de colesterol un punto de nucleación donde crecer en forma de cristales de hidroxiapatita⁽²⁷³⁾.

De los estudios observacionales realizados al respecto podemos deducir que la calcificación intimal es un proceso en el que están implicados el reclutamiento celular,



diferentes factores osteogénicos, los componentes de la matriz y la concentración de calcio y fósforo, llegando a producir la calcificación del tejido por mecanismos que, sin ser completamente comprendidos, presentan una clara similitud con los de osteogénesis y remodelación ósea.

Por otra parte, el análisis de los mecanismos que desencadenan y regulan el proceso de calcificación arterial ha estado limitado por la falta de sistemas de medición *in vivo*. Actualmente, la TC de doble fuente (DSCT) o con multidetector han permitido la identificación y cuantificación del calcio mineral (hidroxiapatita, Ca) en la placa de ateroma^(204, 266).

Ensayos previos han demostrado la precisión de la TC en la determinación del contenido de Ca en muestras de endarterectomía (EA) carotídea *in vitro* y su comparación con la masa residual tras su incineración^(5, 193).

Los resultados de este estudio demostraron un incremento promedio del contenido de calcio con respecto al valor basal del 13,5% (rango -6% hasta +125%). Es de destacar que 23 (76,7%) pacientes se encontraban bajo tratamiento con estatinas.

La asociación entre calcificación arterial y osteoporosis no es una observación reciente. En el seguimiento de una cohorte de 2059 participantes en el estudio Framingham, las mujeres con mayor pérdida de calcio, valorada mediante radiografía simple del carpo, presentaron una incidencia mayor de eventos coronarios en un seguimiento de más de 30 años. Sin embargo, no se encontró dicha asociación entre los hombres incluidos en el mismo estudio⁽²²⁹⁾.

Trabajos posteriores, en los que se valoró la reabsorción ósea en relación a la calcificación arterial, basados en exámenes con AngioTC, han demostrado resultados similares⁽²³³⁾. Otros estudios se han centrado en la incidencia de fracturas vertebrales

en relación al depósito de calcio en la pared aórtica. Bajo este planteamiento, Shultz y cols.⁽²⁷⁴⁾ encontraron, en un estudio retrospectivo sobre 2348 mujeres en las que se examinó dicha relación con TC, una probabilidad 4,8 veces superior entre aquellas con calcificación vascular.

Los datos anteriormente mencionados avalan la hipótesis de una conexión entre osteoporosis y calcificación arterial. Las principales evidencias en contra de dicha relación son a partir de estudios observacionales -casi exclusivamente en cohortes de mujeres menopaúsicas-^(275, 276) y donde la significación estadística de su asociación se pierde en algunos de ellos, tras ajustar los resultados por la edad de los participante.

El presente estudio, centrado en hombres (tan solo se incluyeron 2 mujeres) y con un rango de edad comprendido entre 53 y 81 años (media[DE]: 67,6[7,9]), permite analizar esta posible asociación desde una perspectiva distinta, focalizada en la evolución temporal de la calcificación arterial y la variación en la densidad ósea de pacientes con patología arteriosclerótica conocida.

Diversos estudios sugieren una posible relación entre calcificación vascular y osteoporosis como consecuencia de la dislipemia, de elevada prevalencia en estos pacientes^(233, 277). Este efecto se ha visto apoyado por la observación in vitro de la capacidad de las LDL oxidadas para estimular la diferenciación osteoblástica en la pared arterial, asociado a su efecto paradójico en el tejido óseo, donde estimularían la diferenciación osteoclástica e inhibirían la osteobástica⁽²⁷⁸⁾.

En el presente estudio, solo se encontró una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de colesterol HDL y la variación relativa, respecto al valor basal, de la densidad ósea ($r=-0,579$, $p=0,009$) que sugiere un papel protector frente a la osteoporosis.



Algunos autores han sugerido un mecanismo fisiopatológico común entre el proceso de calcificación arterial y el metabolismo Ca/P. Doherty y cols.⁽³⁸⁾ estudiaron la masa de calcio, mediante TC, y su asociación con los niveles séricos de vitamina D₃, en 283 pacientes asintomáticos con factores de riesgo cardiovascular. Los resultados obtenidos indicaron que los niveles de 1,25- dihidroxivitaminaD₃ se relacionaban de manera independiente e inversa con la calcificación coronaria obtenida mediante TC. Ante estos resultados, en un trabajo posterior, los autores hipotetizaban sobre un posible papel protector de la 1,25-dihidroxivitaminaD₃ frente a la calcificación, al promover el desarrollo de células de comportamiento osteoclástico en la pared arterial⁽³⁹⁾. Sin embargo, esta observación contrasta con la experiencia adquirida en los modelos animales, donde los suplementos de vitamina D en la dieta favorecieron la calcificación vascular⁽²⁷⁹⁾. El análisis de los resultados del estudio *Framingham Offspring*, que incluyó a más de 1.700 participantes, sin signos de enfermedad cardiovascular, con un seguimiento medio de 5,4 años, mostró un efecto bifásico, con aumento del riesgo cardiovascular cuando los niveles de vit D en plasma eran <15 o >30 ng/ml⁽²⁸⁰⁾.

El presente estudio, muestra niveles más bajos de vit D en plasma en aquellos pacientes con progresión de la AE carotídea, aunque esta diferencia fue marginalmente significativa. Sin embargo, sí se obtuvo una correlación positiva entre el aumento del contenido de Ca intraplaca y los niveles en plasma de vit D, aunque este hallazgo no se acompañó de variaciones en otros parámetros del metabolismo Ca-P. Estos resultados sugieren que los mecanismos que modulan los depósitos de calcio en la placa AE, no tienen por qué diferir necesariamente de los que actúan sobre el hueso.

Existen otros estudios que también relacionan la Vitamina D con la calcificación vascular⁽²⁸¹⁾.

Los niveles plasmáticos de vit D presentaron una correlación inversa con la densidad ósea en la determinación basal. Sin embargo, tan solo la concentración de P en orina se asoció con una tendencia a la progresión del contenido arterial de Ca. Ningún otro parámetro del metabolismo Ca/P fue identificado como significativo con los niveles establecidos ni en el análisis univariable ni en el multivariable. El valor de dicha asociación debe contemplarse con precaución, aunque dicha variable sí fue aceptada en el modelo multivariable final.

No obstante, los mecanismos subyacentes a las observaciones anteriormente descritas permanecen inciertos, siendo necesarios nuevos estudios que expliquen la potencial relación entre la calcificación arterial y la vitamina D o la PTH.

El distinto comportamiento de los mecanismos desencadenantes y reguladores de la osteogénesis y la reabsorción ósea en la pared vascular y hueso siguen siendo una incógnita. Sustentada en los hallazgos epidemiológicos anteriormente citados, la que se ha dado en llamar la “paradoja del calcio” ha centrado el interés de numerosas investigaciones.

En el presente estudio, al igual que en las series anteriormente mencionadas, se registró un incremento de la calcificación arterial y una tendencia significativa a la descalcificación ósea al cabo de un año de seguimiento.

Este efecto, que haría pensar en una relación causal entre ambos procesos, no fue confirmado en el análisis de regresión. Sus resultados sugieren una tendencia al aumento de la calcificación arterial que permite adaptar un modelo de relación lineal con el depósito de calcio óseo, ajustado por la concentración de P en orina. En otras



palabras, una mayor tendencia a la osteoporosis se asoció con una menor tendencia a la progresión del calcio intraplaca. La variabilidad explicada por el modelo fue solo moderada ($R^2=0,62$) y no permite establecer una relación causal. No obstante, los resultados de este estudio no permiten descartar que los procesos de calcificación arterial y ósea se rijan por similares mecanismos desencadenantes y de regulación.

La OPN, por su parte, actúa como inhibidor de la formación ósea y la calcificación. Se ha demostrado que esta proteína ejerce un papel importante en la diferenciación fenotípica monocito/macrófago⁽²⁸²⁾, así como en la calcificación inducida por fosfato⁽²⁸³⁾. Algunos estudios describen la OPN circulante como un marcador independiente de severidad en aterosclerosis coronaria y se ha asociado también a un aumento del riesgo de eventos cardíacos adversos⁽²⁸⁴⁾. Es por ello que, en este trabajo, se han determinado los niveles de OPN en el suero de los pacientes y se ha estudiado su posible relación con los FRCV y la progresión de placa, sin encontrar resultados significativos que relacionen los niveles de OPN en suero y el contenido de Ca en la placa carotídea, lo cuál no excluye, que pueda ser un marcador de riesgo de AE. No obstante, se trata de un estudio preliminar y sería necesario un trabajo más amplio, empleando un número mayor de muestras, para confirmar estos resultados.

Así mismo, la OPG se ha relacionado con el metabolismo óseo y con la calcificación vascular. Existen varias evidencias que refuerzan la hipótesis de la señalización vía OPG/RANKL como nexo de unión entre ambos procesos. Las cepas de ratones con delección del gen de la OPG desarrollan osteoporosis y calcificaciones vasculares⁽²⁸⁵⁾. Por otra parte, un exceso de mortalidad coronaria se ha relacionado con niveles plasmáticos elevados de OPG⁽²⁸⁶⁾. En la misma línea, otros estudios han evaluado los niveles séricos de OPG en pacientes con enfermedad vascular establecida y factores de

riesgo cardiovascular como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus⁽²⁸⁷⁾. En estos estudios, los niveles séricos altos de OPG se encontraron en pacientes con enfermedad arterial avanzada, lo que podría representar un mecanismo insuficiente de contraregulación para prevenir la progresión del daño vascular. Contrariamente, la deficiencia de OPG se relacionaría con el proceso de calcificación vascular, ratificado con modelos animales que sugerirían un papel protector vascular de la OPG^(288, 289).

En cuanto al estudio de la relación entre los niveles séricos de OPG y los parámetros del metabolismo óseo y lipídico, la correlación positiva observada entre la concentración de OPG y la de homocisteína y PTH podría explicarse debido a mecanismos compensatorios ya que se trata de proteínas que ejercen un efecto antagonista sobre el metabolismo óseo. De hecho, estos resultados concuerdan con los publicados por otros autores, que también relacionan positivamente OPG y homocisteína en pacientes con patologías vasculares⁽²⁹⁰⁾.

Aunque no se haya observado ninguna correlación entre la concentración sérica de OPG y la evolución del contenido de Ca en la placa de ateroma, esto no significa que se pueda descartar la OPG como potencial biomarcador del riesgo de aterosclerosis en la población general. De hecho, existen publicaciones que evidencian el importante papel de la OPG como biomarcador del riesgo cardiovascular⁽²⁹¹⁾.

La formación neta de densidad ósea está condicionada por el balance entre la actividad osteoblástica y osteoclástica. Ésta implica la interacción entre el receptor activador del factor nuclear κ B (RANK) con su ligando (RANKL) y la OPG como inhibidor de esta interacción⁽²⁴⁾. En la pared vascular, el proceso de calcificación parece estar relacionado con el balance de los niveles de RANKL/OPG. Panizo y cols.⁽²⁷⁷⁾, contrastaron esta hipótesis, utilizando un modelo de calcificación *in vitro*. En su



estudio, demostraron que la adición de RANKL a CMLs en cultivo aceleraban la mineralización, valorada a través del incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, y la incorporación de iones calcio, efectos que eran inhibidos tras la adición de OPG al medio. Además, esta acción parecía mediada por la BMP 4 cuya síntesis aumentaba con la expresión de la OPG.

La conexión entre la calcificación vascular y la descalcificación ósea, a nivel molecular, no se ha analizado de forma específica en este estudio. El posible papel de la alteración de la señalización a través de la vía OPG/RANKL, sugeridos por otros autores, requerirá de nuevas investigaciones bajo esta perspectiva.

El estudio de polimorfismos del gen codificador de la OPG, y la relación con el valor en suero de la proteína, se analizan en el apartado siguiente.

Las principales limitaciones de esta parte del estudio, al igual que en el apartado anterior, se relacionan con las dificultades propias al método de medición: medición volumétrica del contenido de calcio, no de la masa de calcio, así como la asunción de un modelo lineal de relación en las variaciones del contenido de calcio, tanto intra-arterial como ósea. Estudios previos sugieren que dicha relación, al igual que en la mayoría de procesos biológicos seguiría una distribución sigmoidea⁽²²⁷⁾.

5.2.4 ANÁLISIS GENÉTICO (POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA OPG) Y PROGRESIÓN DE LA CALCIFICACIÓN EN LA PLACA DE ATEROMA

Los polimorfismos del gen de la OPG estudiados en este trabajo, no hemos encontrado evidencias que los relacionen con la presencia de placa de ateroma ya que su distribución en los pacientes de la muestra es comparable a su distribución en la población sana. Estos resultados concuerdan con los publicados por algunos autores. Así, Soufi y cols.⁽²⁹²⁾ no encontraron relación entre ninguno de estos 7 polimorfismos, estudiados de manera individual, y la presencia de coronariopatía, aunque encontraron una ligera sobrerrepresentación de la combinación 950TC/1181GC y 950CC/1181CC en pacientes con afectación coronaria con respecto a controles sin ella. Del mismo modo, Rhee y cols.⁽²⁹³⁾ no encontraron asociación entre la distribución de los SNP *rs3102735*, *rs3134070*, *rs3134069* y *rs2073617* y la calcificación aórtica en mujeres coreanas. Sin embargo, recientemente Straface y cols.⁽²⁹⁴⁾ publicaron unos resultados sorprendentes, en los que asociaban los polimorfismos *rs2073617*, *rs2073618* y *rs3134069*, de manera independiente, a la presencia de placa carotídea e, incluso, fueron capaces de relacionarlos con su estabilidad.

Dado que la mayoría de los SNPs estudiados en este trabajo se encuentran en el promotor del gen, tiene sentido pensar que estas modificaciones puntuales podrían repercutir en una alteración de los niveles de expresión de la proteína, más que en su función propiamente dicha. Sin embargo, al analizar los niveles de proteína de los pacientes, no se observó ninguna relación significativa con la distribución genotípica.

Aunque nuestros resultados están limitados por el bajo número de casos incluidos en el estudio, éstos coinciden con los publicados por otros autores⁽²⁹³⁾ que tampoco



lograron establecer una asociación entre la distribución de los SNPs y la concentración de proteína sérica. Sin embargo, nuevamente, estos resultados difieren con los obtenidos por Straface y cols.⁽²⁹⁴⁾, quienes publicaron el primer trabajo en el que se encontró una asociación entre *rs2073617*, *rs2073618* y *rs3134069* y los niveles de OPG en suero. Desconocemos los motivos de las diferencias entre los resultados obtenidos por los distintos grupos, tanto en lo referente a la asociación de los polimorfismos con patologías cardiovasculares como a su asociación con los niveles de proteína. Podría ser debido a las diferencias étnicas de los sujetos de estudio, a los criterios de inclusión de los pacientes o al tamaño poblacional seleccionado. En cualquier caso, serían necesarios más estudios para elucidar el motivo de estas diferencias.

Así pues, aunque los resultados derivados de este estudio no son concluyentes en lo que respecta a la relación de la OPG con el proceso de calcificación de la placa de ateroma, algunas de las relaciones observadas siguen reforzando la hipótesis de que la calcificación vascular y el metabolismo óseo podrían ser procesos relacionados a nivel molecular. Además, el hecho de que la concentración de OPG sérica no sea un buen indicador de la evolución de la placa, no significa que no pueda ser un buen marcador del riesgo de AE.

Finalmente, cómo se ha apuntado anteriormente, se trata de un estudio preliminar limitado por el número de casos analizados y, por tanto, sería necesario corroborar los resultados obtenidos con un tamaño de muestra mayor.

5.2.5 FORTALEZAS Y LIMITACIONES

El primer punto a destacar entre sus fortalezas es el mismo propósito del estudio, ya que existen en la literatura pocas publicaciones acerca de la progresión del Ca mineral *in vivo*, pero, aún menos, trabajos en los que se correlacione la calcificación de la placa carotídea con el metabolismo óseo desde una perspectiva global, mediante la cuantificación de los fenómenos de descalcificación, el estudio de los factores humorales asociados y la posible relación de los polimorfismos genéticos en la expresión de proteínas relacionadas con la calcificación. El carácter prospectivo de este estudio reforzaría el valor de los datos obtenidos.

La introducción del concepto de medición volumétrica, podría explicar aquellos eventos neurológicos que no se pueden explicar bajo el concepto clásico de estenosis hemodinámica, en pacientes con una reducción de la luz arterial moderada (50-70%). La medición volumétrica o “carga de placa”, unido a la caracterización de la placa de ateroma *in vivo* mediante métodos de imagen (AngioTC o AngioRM de alta resolución), podría tener un papel determinante en futuros protocolos para la indicación terapéutica de pacientes asintomáticos de riesgo.

Así mismo, el estudio de la progresión de la calcificación de la placa carotídea, como se ha visto en este estudio, puede ser un determinante en la evolución de la misma. Así, la carga de Ca y su distribución en la placa AE, podrían ser utilizados como marcadores pronósticos en la asignación de riesgo ateroembólico en nuestros pacientes.

Finalmente, uno de los objetivos de este estudio ha consistido en analizar la relación entre los fenómenos de calcificación de la placa carotídea y la osteoporosis.



Sin duda, para aclarar los complejos vínculos que los unen, son necesarios conocimientos adicionales para comprender mejor los aspectos fisiopatológicos comunes y la naturaleza de las relaciones entre los procesos de calcificación arterial y la pérdida ósea. Este conocimiento será fundamental para desarrollar nuevas perspectivas de futuro hacia estrategias comunes de prevención, evaluación y tratamiento tanto de la osteoporosis como de la calcificación vascular.

Este estudio posee unas limitaciones generales, relacionadas, por un lado, con la técnica de determinación del calcio y, por otro, con la población de estudio. Respecto a la primera, al no existir un protocolo automatizado para aislar la placa de Ca en las imágenes de la TC, utilizamos un método semiautomático, con correcciones manuales para la selección de los segmentos a estudiar, por lo que esto podría representar un sesgo de subjetividad, pero que no fue significativo a tenor de los resultados de correlación inter e intraobservador. Respecto a la población de estudio, todos los pacientes eran asintomáticos, y a pesar de tratarse de un estudio longitudinal, el tiempo de seguimiento se limitó a un año, y durante este periodo, los pacientes no experimentaron cambios clínicos de naturaleza neurológica. Por este motivo, la relación entre la variación del contenido de Ca en la placa y su relación con la aparición de eventos neurológicos, uno de los objetivos planteados al inicio del estudio y sugerida por los resultados del estudio piloto, no nos fue posible demostrarla bajo esta perspectiva.

Por otro lado, en un estudio prospectivo como el planteado, es imposible desvincular el efecto de los fármacos sobre la placa de ateroma y la progresión de la calcificación. Recordemos que, aunque menos del 30% de los pacientes estaban sin tratamiento con estatinas, y tal como algunos autores apuntan, éstas pueden reducir

la progresión de la placa⁽²⁹⁵⁾. Así, para poder separar completamente la influencia de los FRCV en la evolución de la placa y la influencia inversa de los fármacos de prevención secundaria, sería necesario un estudio clínico aleatorizado.

En cuanto a las limitaciones específicas para cada uno de los objetivos del estudio, estas aparecen detalladas en los epígrafes anteriores (5.1 a 5.4).

Esta línea de investigación continuará en el futuro con nuevos proyectos cuyo desarrollo estará condicionado a la adecuación de sus diseños y viabilidad económica.

El principal foco de atención de estos estudios está dirigido hacia:

1. Desarrollo de algoritmos automatizados para la estimación de la masa de Ca en protocolos de AngioTC.
2. Búsqueda de nuevos biomarcadores de calcificación y progresión de placa AE.



6. CONCLUSIONES

1. La medición volumétrica de la ateromatosis carotídea supone un nuevo concepto basado en la variación del volumen de la bifurcación carotídea por efecto de la carga neta de placa. Por su precisión en la detección de cambios mínimos en el diámetro arterial, y buena concordancia intra e interobservador, este método puede ser de utilidad en estudios de progresión/regresión de la placa de ateroma.
2. La identificación y cuantificación del calcio en la pared arterial mediante AngioTC permite evaluar su distribución y estimar su contenido con una precisión similar a la de su medición directa en muestras tisulares.
3. Los resultados de las investigaciones preliminares de este estudio sugieren que los pacientes con estenosis moderada o severa ($ECl > 50\%$), y neurológicamente asintomáticos, presentan un mayor contenido de Ca que los sintomáticos con grados similares de ECl. Además, su localización en la superficie de la placa AE podría jugar un papel protector.
4. El perfil temporal de la evolución de las lesiones carotídeas, sugiere una relación causa-efecto entre su progresión y el contenido de calcio intraplaca. Los resultados obtenidos, muestran una tendencia a la progresión de aquellas placas con menor contenido de calcio.
5. Encontramos una tendencia independiente a la progresiva calcificación arterial y descalcificación ósea. Sin embargo, los resultados sugieren una relación temporal directa en la evolución del depósito de calcio en ambas localizaciones,



por lo que no es posible descartar que su modulación se rija por mecanismos similares.

6. Los resultados de este estudio no mostraron relación entre el contenido de calcio en la placa carotídea y los niveles en suero de osteopontina (OPN) y osteoprotegerina (OPG), aunque no es posible descartar su posible papel como biomarcadores de riesgo de arteriosclerosis en la población general.
7. No se observó una relación estadísticamente significativa entre la distribución de los SNPs analizados y los niveles de la OPG en los pacientes estudiados. Al tratarse de un estudio preliminar limitado por el número de casos, sería necesario corroborar los resultados obtenidos en una población más amplia.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Rerkasem K, Rothwell PM. Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(4):CD001081.
2. Karlsson L, Kangefjard E, Hermansson S, Stromberg S, Osterberg K, Nordanstig A, et al. Risk of Recurrent Stroke in Patients with Symptomatic Mild (20-49% NASCET) Carotid Artery Stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016;52(3):287-94.
3. Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Phillips CD, Kramer CM. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;184(1):295-8.
4. Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Katz D, et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg.* 2004;40(2):262-9.
5. Miralles M, Merino J, Busto M, Perich X, Barranco C, Vidal-Barraquer F. Quantification and characterization of carotid calcium with multi-detector CT-angiography. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;32(5):561-7.
6. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev.* 1989;47(1):23-5.
7. Monckeberg JG. Uber die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch Pathol Anat.* 1903;171:141–167
8. Micheletti RG, Fishbein GA, Currier JS, Fishbein MC. Monckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of Monckeberg sclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(1):43-7.
9. Slevin M, Wang Q, Font MA, Luque A, Juan-Babot O, Gaffney J, et al. Atherothrombosis and plaque heterology: different location or a unique disease? *Pathobiology.* 2008;75(4):209-25.
10. Sohn YH, Cheon HY, Jeon P, Kang SY. Clinical implication of cerebral artery calcification on brain CT. *Cerebrovasc Dis.* 2004;18(4):332-7.
11. Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, van Engelshoven JM, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):185-97.



12. Kalamogias A, Siasos G, Oikonomou E, Tsalamandris S, Mourouzis K, Tsigkou V, et al. Basic Mechanisms in Atherosclerosis: The Role of Calcium. *Med Chem.* 2016;12(2):103-13.
13. Bryce DL, Bultz EB, Aebi D. Calcium-43 chemical shift tensors as probes of calcium binding environments. Insight into the structure of the vaterite CaCO₃ polymorph by ⁴³Ca solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2008;130(29):9282-92.
14. Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *The Biochemical journal.* 1994;302 (Pt 1):175-9.
15. Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN, Smith SK, Lawton JJ, Ostler EL, et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp Gerontol.* 2009;44(10):659-65.
16. Hetterich H, Webber N, Willner M, Herzen J, Birnbacher L, Hipp A, et al. AHA classification of coronary and carotid atherosclerotic plaques by grating-based phase-contrast computed tomography. *Eur Radiol.* 2016;26(9):3223-33.
17. Juan-Babot JO, Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Badimon L. [Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity]. *Rev Esp Cardiol.* 2003;56(10):978-86.
18. Rocha-Singh KJ, Zeller T, Jaff MR. Peripheral arterial calcification: prevalence, mechanism, detection, and clinical implications. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014;83(6):E212-20.
19. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006;99(10):1044-59.
20. Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol.* 2008;27(7):600-8.
21. Arboleya L, Castaneda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin.* 2013;9(5):303-15.
22. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J.* 2014;35(23):1515-25.

23. Cozzolino M, Dusso AS, Slatopolsky E. Role of calcium-phosphate product and bone-associated proteins on vascular calcification in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(11):2511-6.
24. Vassalle C, Mazzone A. Bone loss and vascular calcification: A bi-directional interplay? *Vascul Pharmacol*. 2016;86:77-86.
25. Kovesdy CP, Lu JL, Malakauskas SM, Andress DL, Kalantar-Zadeh K, Ahmadzadeh S. Paricalcitol versus ergocalciferol for secondary hyperparathyroidism in CKD stages 3 and 4: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis*. 2012;59(1):58-66.
26. Avolio A. Arterial Stiffness. *Pulse (Basel)*. 2013;1(1):14-28.
27. Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ. Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *British medical journal*. 1982;284(6320):928-30.
28. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(4):1597-604.
29. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(8):978-83.
30. Miller RG, Secrest AM, Ellis D, Becker DJ, Orchard TJ. Changing impact of modifiable risk factors on the incidence of major outcomes of type 1 diabetes: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 2013;36(12):3999-4006.
31. Edmonds ME. Medial arterial calcification and diabetes mellitus. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 2000;89 Suppl 2:101-4.
32. Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia*. 1988;31(1):16-23.
33. Portoles J, Lopez-Gomez JM, Aljama P. [Cardiovascular risk in hemodialysis in Spain: prevalence, management and target results (MAR study)]. *Nefrologia*. 2005;25(3):297-306.
34. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(7):1453-64.



35. Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19 Suppl 5:V59-66.
36. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1731-40.
37. Dziedzic EA, Przychodzen S, Dabrowski M. The effects of vitamin D on severity of coronary artery atherosclerosis and lipid profile of cardiac patients. *Arch Med Sci*. 2016;12(6):1199-206.
38. Doherty TM, Tang W, Dascalos S, Watson KE, Demer LL, Shavelle RM, et al. Ethnic origin and serum levels of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 are independent predictors of coronary calcium mass measured by electron-beam computed tomography. *Circulation*. 1997;96(5):1477-81.
39. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, et al. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11201-6.
40. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2302-9.
41. Cardus A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res*. 2007;22(6):860-6.
42. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(5):E686-96.
43. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(6):1599-605.
44. Trion A, van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J*. 2004;147(5):808-14.
45. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007;5(2):265-82.
46. Demer L, Tintut Y. The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor-kappaB signaling in atherosclerotic calcification. *Circ Res*. 2011;108(12):1482-93.

47. Tesauro M, Mauriello A, Rovella V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Cardillo C, Melino G, et al. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. *J Intern Med.* 2017;281(5):471-82.
48. Pelisek J, Wendorff H, Wendorff C, Kuehnl A, Eckstein HH. Age-associated changes in human carotid atherosclerotic plaques. *Ann Med.* 2016;48(7):541-51.
49. van Oostrom O, Velema E, Schoneveld AH, de Vries JP, de Bruin P, Seldenrijk CA, et al. Age-related changes in plaque composition: a study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(3):126-34.
50. Nilsson-Berglund LM, Zetterqvist AV, Nilsson-Ohman J, Sigvardsson M, Gonzalez Bosc LV, Smith ML, et al. Nuclear factor of activated T cells regulates osteopontin expression in arterial smooth muscle in response to diabetes-induced hyperglycemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):218-24.
51. Kahler P, Grevstad B, Almdal T, Gluud C, Wetterslev J, Lund SS, et al. Targeting intensive versus conventional glycaemic control for type 1 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomised clinical trials. *BMJ Open.* 2014;4(8):e004806.
52. Bailey CJ, Grant PJ. The UK Prospective Diabetes Study. *Lancet.* 1998;352(9144):1932; author reply 4.
53. Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Segura-Galindo A, Del Canizo-Gomez FJ. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World J Diabetes.* 2014;5(4):444-70.
54. Schauer IE, Snell-Bergeon JK, Bergman BC, Maahs DM, Kretowski A, Eckel RH, et al. Insulin resistance, defective insulin-mediated fatty acid suppression, and coronary artery calcification in subjects with and without type 1 diabetes: The CACTI study. *Diabetes.* 2011;60(1):306-14.
55. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:918267.
56. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol.* 2016;6(2):561-601.
57. Joergensen C, Reinhard H, Schmedes A, Hansen PR, Wiinberg N, Petersen CL, et al. Vitamin D levels and asymptomatic coronary artery disease in type 2 diabetic



patients with elevated urinary albumin excretion rate. *Diabetes Care*. 2012;35(1):168-72.

58. O'Malley PG, Taylor AJ, Jackson JL, Doherty TM, Detrano RC. Prognostic value of coronary electron-beam computed tomography for coronary heart disease events in asymptomatic populations. *Am J Cardiol*. 2000;85(8):945-8.

59. Dendukuri N, Chiu K, Brophy JM. Validity of electron beam computed tomography for coronary artery disease: asystematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2007;5:35.

60. Callister TQ, Raggi P, Cooil B, Lippolis NJ, Russo DJ. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on coronary artery disease as assessed by electron-beam computed tomography. *N Engl J Med*. 1998;339(27):1972-8.

61. Kupcsik L, Meurya T, Flury M, Stoddart M, Alini M. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *J Cell Mol Med*. 2009;13(11-12):4465-73.

62. Saremi A, Bahn G, Reaven PD, Investigators V. Progression of vascular calcification is increased with statin use in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes Care*. 2012;35(11):2390-2.

63. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(4):680-7.

64. Reilly MP, Iqbal N, Schutta M, Wolfe ML, Scally M, Localio AR, et al. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3872-8.

65. Hamrick MW, Della-Fera MA, Choi YH, Pennington C, Hartzell D, Baile CA. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res*. 2005;20(6):994-1001.

66. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. 1999;140(4):1630-8.

67. Anagnostis P, Stevenson JC, Crook D, Johnston DG, Godsland IF. Effects of gender, age and menopausal status on serum apolipoprotein concentrations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;85(5):733-40.
68. El Khoudary SR, Hutchins PM, Matthews KA, Brooks MM, Orchard TJ, Ronsein GE, et al. Cholesterol Efflux Capacity and Subclasses of HDL Particles in Healthy Women Transitioning Through Menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(9):3419-28.
69. Manson JE, Chlebowski RT, Stefanick ML, Aragaki AK, Rossouw JE, Prentice RL, et al. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA*. 2013;310(13):1353-68.
70. Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H, Lethaby A. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012(7):CD004143.
71. Shargorodsky M, Boaz M, Luckish A, Matas Z, Gavish D, Mashavi M. Osteoprotegerin as an independent marker of subclinical atherosclerosis in osteoporotic postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):608-11.
72. Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(19):10022-7.
73. Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fievet C, Faye JC, et al. 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(11):2679-84.
74. Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol*. 2002;89(12A):12E-7E; discussion 7E-8E.
75. Seeman E. Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men. *Curr Osteoporos Rep*. 2004;2(3):90-6.
76. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*. 2002;23(1):90-119.
77. Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond)*. 2006;111(2):107-18.
78. Bandara N, Gurusinge S, Lim SY, Chen H, Chen S, Wang D, et al. Molecular control of nitric oxide synthesis through eNOS and caveolin-1 interaction regulates



osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by modulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):182.

79. Manson JE, Martin KA. Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med.* 2001;345(1):34-40.

80. Kim OY, Chae JS, Paik JK, Seo HS, Jang Y, Cavaillon JM, et al. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age (Dordr).* 2012;34(2):415-25.

81. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(6):673-85.

82. Chen NX, Moe SM. Vascular calcification: pathophysiology and risk factors. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14(3):228-37.

83. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(1):115-20.

84. Marie PJ, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(1):1-10.

85. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res.* 2010;89(4):331-43.

86. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272-88.

87. Garcia de Vinuesa A, Abdelilah-Seyfried S, Knaus P, Zwijsen A, Bailly S. BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;27:65-79.

88. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int.* 2012;23(8):2067-79.

89. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235(1):176-90.

90. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science.* 2012;337(6090):59-64.

91. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45.

92. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001;81(1):419-47.

93. Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature*. 2008;453(7196):788-92.
94. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(4):1800-9.
95. Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet*. 1997;350 Suppl 1:S19-13.
96. Herrington DM, Reboussin DM, Klein KP, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, et al. The estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study: study design and baseline characteristics of the cohort. *Control Clin Trials*. 2000;21(3):257-85.
97. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.
98. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-23.
99. Lello S, Capozzi A, Scambia G. Osteoporosis and cardiovascular disease: an update. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(8):590-4.
100. Choi BG, Vilahur G, Cardoso L, Fritton JC, Ibanez B, Zafar MU, et al. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(4):211-7.
101. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-8.
102. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(4):463-74.
103. Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):321-9.
104. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res*. 2004;95(11):1046-57.



105. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Fabris F, Grego F, Gerosa G, et al. Platelets express and release osteocalcin and co-localize in human calcified atherosclerotic plaques. *J Thromb Haemost.* 2013;11(2):357-65.
106. Higgins CL, Isbilir S, Basto P, Chen IY, Vaduganathan M, Vaduganathan P, et al. Distribution of alkaline phosphatase, osteopontin, RANK ligand and osteoprotegerin in calcified human carotid atheroma. *Protein J.* 2015;34(5):315-28.
107. Schinke T, Karsenty G. Vascular calcification--a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(9):1272-4.
108. Viegas CS, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Vitorino R, Luis IM, et al. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):399-408.
109. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, Hackeng TM, Shanahan CM, Vermeer C, et al. Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost.* 2007;5(12):2503-11.
110. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *J Vasc Res.* 2003;40(6):531-7.
111. Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, et al. Osteoblast-Specific gamma-Glutamyl Carboxylase-Deficient Mice Display Enhanced Bone Formation With Aberrant Mineralization. *J Bone Miner Res.* 2015;30(7):1245-54.
112. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):333-7.
113. Ding Y, Chen J, Cui G, Wei Y, Lu C, Wang L, et al. Pathophysiological role of osteopontin and angiotensin II in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;471(1):5-9.
114. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 1999;84(2):166-78.
115. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res.* 2005;96(7):717-22.

116. Lund SA, Wilson CL, Raines EW, Tang J, Giachelli CM, Scatena M. Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via alpha4 and alpha9 integrins and survival via the alpha4 integrin. *J Cell Biochem.* 2013;114(5):1194-202.
117. Mohamadpour AH, Abdolrahmani L, Mirzaei H, Sahebkar A, Moohebati M, Ghorbani M, et al. Serum osteopontin concentrations in relation to coronary artery disease. *Arch Med Res.* 2015;46(2):112-7.
118. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost.* 2003;1(1):178-85.
119. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Zeitschrift fur Kardiologie.* 2000;89 Suppl 2:63-8.
120. Peyser PA, Bielak LF, Chu JS, Turner ST, Ellsworth DL, Boerwinkle E, et al. Heritability of coronary artery calcium quantity measured by electron beam computed tomography in asymptomatic adults. *Circulation.* 2002;106(3):304-8.
121. O'Donnell CJ, Chazaro I, Wilson PW, Fox C, Hannan MT, Kiel DP, et al. Evidence for heritability of abdominal aortic calcific deposits in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2002;106(3):337-41.
122. Lange LA, Lange EM, Bielak LF, Langefeld CD, Kardia SL, Royston P, et al. Autosomal genome-wide scan for coronary artery calcification loci in sibships at high risk for hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(3):418-23.
123. Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circ Res.* 2011;109(5):578-92.
124. Polfus LM, Smith JA, Shimmin LC, Bielak LF, Morrison AC, Kardia SL, et al. Genome-wide association study of gene by smoking interactions in coronary artery calcification. *PLoS One.* 2013;8(10):e74642.
125. Woodard GA, Narla VV, Ye R, Cauley JA, Thompson T, Matthews KA, et al. Racial differences in the association between carotid plaque and aortic and coronary artery calcification among women transitioning through menopause. *Menopause.* 2012;19(2):157-63.



126. Guney AI, Ergec D, Kirac D, Ozturhan H, Caner M, Koc G, et al. Effects of ACE polymorphisms and other risk factors on the severity of coronary artery disease. *Genet Mol Res.* 2013;12(4):6895-906.
127. Pfohl M, Athanasiadis A, Koch M, Clemens P, Benda N, Haring HU, et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with coronary artery plaque calcification as assessed by intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(5):987-91.
128. Oei HH, Sayed-Tabatabaei FA, Hofman A, Oudkerk M, van Duijn CM, Witteman JC. The association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary calcification. The Rotterdam Coronary Calcification Study. *Atherosclerosis.* 2005;182(1):169-73.
129. Koopal C, Geerlings MI, Muller M, de Borst GJ, Algra A, van der Graaf Y, et al. The relation between apolipoprotein E (APOE) genotype and peripheral artery disease in patients at high risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2016;246:187-92.
130. Henriques AD, Tonet-Furioso AC, Machado-Silva W, Freitas WM, Quaglia LA, Santos SN, et al. Apolipoprotein E genotype is associated with apolipoprotein B plasma levels but not with coronary calcium score in very elderly individuals in primary care setting. *Gene.* 2014;539(2):275-8.
131. Wang X, Zhang J, Du X, Song M, Jia C, Liu H. Association of A561C and G98T polymorphisms in E-selectin gene with coronary artery disease: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(11):e79301.
132. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90(3):251-62.
133. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(8):1852-61.
134. Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P. The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J.* 2002;23(9):721-5.
135. Pollanen PJ, Lehtimäki T, Ilveskoski E, Mikkelsen J, Kajander OA, Laippala P, et al. Coronary artery calcification is related to functional polymorphism of matrix

metalloproteinase 3: the Helsinki Sudden Death Study. *Atherosclerosis*. 2002;164(2):329-35.

136. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res*. 2010;107(4):485-94.

137. Tunon-Le Poutel D, Cannata-Andia JB, Roman-Garcia P, Diaz-Lopez JB, Coto E, Gomez C, et al. Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification. *Osteoporos Int*. 2014;25(4):1237-46.

138. Crosier MD, Booth SL, Peter I, Dawson-Hughes B, Price PA, O'Donnell CJ, et al. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009;55(1):59-65.

139. Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, et al. Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology*. 1998;139(6):3022-5.

140. Esteghamati A, Aflatoonian M, Rad MV, Mazaheri T, Mousavizadeh M, Nakhjavani M, et al. Association of osteoprotegerin with peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(8-9):412-9.

141. Bjerre M, Hilden J, Kastrup J, Skoog M, Hansen JF, Kolmos HJ, et al. Osteoprotegerin independently predicts mortality in patients with stable coronary artery disease: the CLARICOR trial. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(8):657-64.

142. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):549-53.

143. Pereira RM, Figueiredo CP, Cha CC, Caparbo VF, Oliveira RM, Franco AS, et al. Associations between OPG and RANKL polymorphisms, vertebral fractures, and abdominal aortic calcification in community-dwelling older subjects: the Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH). *Osteoporos Int*. 2016;27(11):3319-29.

144. Osawa M, Tian W, Horiuchi H, Kaneko M, Umetsu K. Association of alpha2-HS glycoprotein (AHSG, fetuin-A) polymorphism with AHSG and phosphate serum levels. *Hum Genet*. 2005;116(3):146-51.



145. Andersen G, Burgdorf KS, Sparso T, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T, et al. AHSB tag single nucleotide polymorphisms associate with type 2 diabetes and dyslipidemia: studies of metabolic traits in 7,683 white Danish subjects. *Diabetes*. 2008;57(5):1427-32.
146. Lehtinen AB, Burdon KP, Lewis JP, Langefeld CD, Ziegler JT, Rich SS, et al. Association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(1):345-52.
147. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, et al. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int*. 2005;67(6):2383-92.
148. Donate-Correa J, Martin-Nunez E, Mora-Fernandez C, Muros-de-Fuentes M, Perez-Delgado N, Navarro-Gonzalez JF. Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. *World J Biol Chem*. 2015;6(4):351-7.
149. Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H, et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res*. 2010;107(4):466-75.
150. Lehtimaki T, Kunnas TA, Mattila KM, Perola M, Penttila A, Koivula T, et al. Coronary artery wall atherosclerosis in relation to the estrogen receptor 1 gene polymorphism: an autopsy study. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(3):176-80.
151. Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):724-36.
152. Huesa C, Staines KA, Millan JL, MacRae VE. Effects of etidronate on the Enpp1(-)/(-) mouse model of generalized arterial calcification of infancy. *Int J Mol Med*. 2015;36(1):159-65.
153. Vyavahare N, Jones PL, Tallapragada S, Levy RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am J Pathol*. 2000;157(3):885-93.
154. Wang J, Yan Y, Chen J, Gong L, Zhang Y, Yuan M, et al. Novel FBN1 mutations are responsible for cardiovascular manifestations of Marfan syndrome. *Mol Biol Rep*. 2016;43(11):1227-32.

155. Mackenzie NC, Staines KA, Zhu D, Genever P, Macrae VE. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct.* 2014;32(2):209-16.
156. Qiao W, Chen L, Zhang M. MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(6):1945-53.
157. Cui RR, Li SJ, Liu LJ, Yi L, Liang QH, Zhu X, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res.* 2012;96(2):320-9.
158. Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA.* 2000;283(21):2810-5.
159. Atalay Y, Asutay F, Agacayak KS, Koparal M, Adali F, Gulsun B. Evaluation of calcified carotid atheroma on panoramic radiographs and Doppler ultrasonography in an older population. *Clin Interv Aging.* 2015;10:1121-9.
160. Acharya UR, Mookiah MR, Vinitha Sree S, Afonso D, Sanches J, Shafique S, et al. Atherosclerotic plaque tissue characterization in 2D ultrasound longitudinal carotid scans for automated classification: a paradigm for stroke risk assessment. *Med Biol Eng Comput.* 2013;51(5):513-23.
161. Brinjikji W, Rabinstein AA, Lanzino G, Murad MH, Williamson EE, DeMarco JK, et al. Ultrasound Characteristics of Symptomatic Carotid Plaques: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cerebrovasc Dis.* 2015;40(3-4):165-74.
162. Schmidt C, Fischer T, Ruckert RI, Oberwahrenbrock T, Harms L, Kronenberg G, et al. Identification of neovascularization by contrast-enhanced ultrasound to detect unstable carotid stenosis. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175331.
163. 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;326(4):242-50.
164. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med.* 1997;336(18):1276-82.
165. Gronholdt ML. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(1):2-13.



166. Skagen K, Skjelland M, Zamani M, Russell D. Unstable carotid artery plaque: new insights and controversies in diagnostics and treatment. *Croat Med J.* 2016;57(4):311-20.
167. Mathiesen EB, Bonna KH, Joakimsen O. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: the tromso study. *Circulation.* 2001;103(17):2171-5.
168. Picano E, Paterni M. Ultrasound tissue characterization of vulnerable atherosclerotic plaque. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):10121-33.
169. Jahromi AS, Cina CS, Liu Y, Clase CM. Sensitivity and specificity of color duplex ultrasound measurement in the estimation of internal carotid artery stenosis: a systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg.* 2005;41(6):962-72.
170. Potkin BN, Bartorelli AL, Gessert JM, Neville RF, Almagor Y, Roberts WC, et al. Coronary artery imaging with intravascular high-frequency ultrasound. *Circulation.* 1990;81(5):1575-85.
171. Nishimura RA, Edwards WD, Warnes CA, Reeder GS, Holmes DR, Jr., Tajik AJ, et al. Intravascular ultrasound imaging: in vitro validation and pathologic correlation. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16(1):145-54.
172. Fujii K, Carlier SG, Mintz GS, Takebayashi H, Yasuda T, Costa RA, et al. Intravascular ultrasound study of patterns of calcium in ruptured coronary plaques. *Am J Cardiol.* 2005;96(3):352-7.
173. Wang X, Lu C, Chen X, Zhao X, Xia D. A new method to quantify coronary calcification by intravascular ultrasound - the different patterns of calcification of acute myocardial infarction, unstable angina pectoris and stable angina pectoris. *J Invasive Cardiol.* 2008;20(11):587-90.
174. Beckman JA, Ganz J, Creager MA, Ganz P, Kinlay S. Relationship of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenoses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1618-22.
175. Shah F, Balan P, Weinberg M, Reddy V, Neems R, Feinstein M, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of atherosclerotic carotid plaque neovascularization: a new surrogate marker of atherosclerosis? *Vasc Med.* 2007;12(4):291-7.

176. Brinjikji W, Huston J, 3rd, Rabinstein AA, Kim GM, Lerman A, Lanzino G. Contemporary carotid imaging: from degree of stenosis to plaque vulnerability. *J Neurosurg.* 2016;2016(1):27-42.
177. Saam T, Ferguson MS, Yarnykh VL, Takaya N, Xu D, Polissar NL, et al. Quantitative evaluation of carotid plaque composition by in vivo MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):234-9.
178. Puppini G, Furlan F, Ciota N, Veraldi G, Piubello Q, Montemezzi S, et al. Characterisation of carotid atherosclerotic plaque: comparison between magnetic resonance imaging and histology. *Radiol Med.* 2006;111(7):921-30.
179. Kim HS, Woo JS, Kim BY, Jang HH, Hwang SJ, Kwon SJ, et al. Biochemical and clinical correlation of intraplaque neovascularization using contrast-enhanced ultrasound of the carotid artery. *Atherosclerosis.* 2014;233(2):579-83.
180. den Hartog AG, Bovens SM, Koning W, Hendrikse J, Luijten PR, Moll FL, et al. Current status of clinical magnetic resonance imaging for plaque characterisation in patients with carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2013;45(1):7-21.
181. Sarikaya B, Lohman B, McKinney AM, Gadani S, Irfan M, Lucato L. Correlation between carotid bifurcation calcium burden on non-enhanced CT and percentage stenosis, as confirmed by digital subtraction angiography. *Br J Radiol.* 2012;85(1015):e284-92.
182. Subedi D, Zishan US, Chappell F, Gregoriades ML, Sudlow C, Sellar R, et al. Intracranial Carotid Calcification on Cranial Computed Tomography: Visual Scoring Methods, Semiautomated Scores, and Volume Measurements in Patients With Stroke. *Stroke.* 2015;46(9):2504-9.
183. Kockelkoren R, Vos A, Van Hecke W, Vink A, Bleys RL, Verdoorn D, et al. Computed Tomographic Distinction of Intimal and Medial Calcification in the Intracranial Internal Carotid Artery. *PLoS One.* 2017;12(1):e0168360.
184. Saba L, Tamponi E, Raz E, Lai L, Montisci R, Piga M, et al. Correlation between fissured fibrous cap and contrast enhancement: preliminary results with the use of CTA and histologic validation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014;35(4):754-9.
185. Health Quality O. 64-slice computed tomographic angiography for the diagnosis of intermediate risk coronary artery disease: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2010;10(11):1-44.



186. Walsh CR, Larson MG, Kupka MJ, Levy D, Vasan RS, Benjamin EJ, et al. Association of aortic valve calcium detected by electron beam computed tomography with echocardiographic aortic valve disease and with calcium deposits in the coronary arteries and thoracic aorta. *Am J Cardiol.* 2004;93(4):421-5.
187. Fischer C, Hulten E, Belur P, Smith R, Voros S, Villines TC. Coronary CT angiography versus intravascular ultrasound for estimation of coronary stenosis and atherosclerotic plaque burden: a meta-analysis. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2013;7(4):256-66.
188. Woodcock RJ, Jr., Goldstein JH, Kallmes DF, Cloft HJ, Phillips CD. Angiographic correlation of CT calcification in the carotid siphon. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999;20(3):495-9.
189. Denzel C, Lell M, Maak M, Hockl M, Balzer K, Muller KM, et al. Carotid artery calcium: accuracy of a calcium score by computed tomography-an in vitro study with comparison to sonography and histology. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;28(2):214-20.
190. Hopper KD, Strollo DC, Mauger DT. Comparison of electron-beam and ungated helical CT in detecting coronary arterial calcification by using a working heart phantom and artificial coronary arteries. *Radiology.* 2002;222(2):474-82.
191. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Jr., Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15(4):827-32.
192. Gutfinger DE, Leung CY, Hiro T, Maheswaran B, Nakamura S, Detrano R, et al. In vitro atherosclerotic plaque and calcium quantitation by intravascular ultrasound and electron-beam computed tomography. *Am Heart J.* 1996;131(5):899-906.
193. Hoffmann U, Kwait DC, Handwerker J, Chan R, Lamuraglia G, Brady TJ. Vascular calcification in ex vivo carotid specimens: precision and accuracy of measurements with multi-detector row CT. *Radiology.* 2003;229(2):375-81.
194. Folco EJ, Sheikine Y, Rocha VZ, Christen T, Shvartz E, Sukhova GK, et al. Hypoxia but not inflammation augments glucose uptake in human macrophages: Implications for imaging atherosclerosis with 18fluorine-labeled 2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(6):603-14.
195. Blomberg BA, Thomassen A, Takx RA, Hildebrandt MG, Simonsen JA, Buch-Olsen KM, et al. Delayed (1)(8)F-fluorodeoxyglucose PET/CT imaging improves

- quantitation of atherosclerotic plaque inflammation: results from the CAMONA study. *J Nucl Cardiol.* 2014;21(3):588-97.
196. Chen W, Dilsizian V. Targeted PET/CT imaging of vulnerable atherosclerotic plaques: microcalcification with sodium fluoride and inflammation with fluorodeoxyglucose. *Curr Cardiol Rep.* 2013;15(6):364.
197. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah AS, Calvert PA, Craighead FH, et al. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet.* 2014;383(9918):705-13.
198. Rudd JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Rafique A, Farkouh M, et al. (18)Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of atherosclerotic plaque inflammation is highly reproducible: implications for atherosclerosis therapy trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(9):892-6.
199. Tarkin JM, Joshi FR, Rudd JH. PET imaging of inflammation in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(8):443-57.
200. Higgins CL, Marvel SA, Morrisett JD. Quantification of calcification in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1567-76.
201. Schmid K, McSharry WO, Pameijer CH, Binette JP. Chemical and physicochemical studies on the mineral deposits of the human atherosclerotic aorta. *Atherosclerosis.* 1980;37(2):199-210.
202. Li C, Ebenstein D, Xu C, Chapman J, Saloner D, Rapp J, et al. Biochemical characterization of atherosclerotic plaque constituents using FTIR spectroscopy and histology. *J Biomed Mater Res A.* 2003;64(2):197-206.
203. Franck P, Nabet P, Dousset B. Applications of infrared spectroscopy to medical biology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998;44(2):273-5.
204. Wintermark M, Jawadi SS, Rapp JH, Tihan T, Tong E, Glidden DV, et al. High-resolution CT imaging of carotid artery atherosclerotic plaques. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(5):875-82.
205. Curtze SC, Kratz M, Steinert M, Vogt S. Step down Vascular Calcification Analysis using State-of-the-Art Nanoanalysis Techniques. *Sci Rep.* 2016;6:23285.



206. Kataoka Y, Wolski K, Uno K, Puri R, Tuzcu EM, Nissen SE, et al. Spotty calcification as a marker of accelerated progression of coronary atherosclerosis: insights from serial intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(18):1592-7.
207. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Wolski K, Sipahi I, Schoenhagen P, Crowe T, et al. Coronary artery calcification and changes in atheroma burden in response to established medical therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(2):263-70.
208. Otsuka F, Finn AV, Virmani R. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? *Atherosclerosis*. 2013;229(1):34-7.
209. Motoyama S, Kondo T, Sarai M, Sugiura A, Harigaya H, Sato T, et al. Multislice computed tomographic characteristics of coronary lesions in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(4):319-26.
210. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, et al. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(40):14678-83.
211. Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10741-6.
212. Nucifora G, Bax JJ, van Werkhoven JM, Boogers MJ, Schuijf JD. Coronary artery calcium scoring in cardiovascular risk assessment. *Cardiovasc Ther*. 2011;29(6):e43-53.
213. Kondos GT, Hoff JA, Sevrukov A, Daviglius ML, Garside DB, Devries SS, et al. Electron-beam tomography coronary artery calcium and cardiac events: a 37-month follow-up of 5635 initially asymptomatic low- to intermediate-risk adults. *Circulation*. 2003;107(20):2571-6.
214. Oudkerk M, Stillman AE, Halliburton SS, Kalender WA, Mohlenkamp S, McCollough CH, et al. Coronary artery calcium screening: current status and recommendations from the European Society of Cardiac Radiology and North American Society for Cardiovascular Imaging. *Eur Radiol*. 2008;18(12):2785-807.
215. Hadamitzky M, Freissmuth B, Meyer T, Hein F, Kastrati A, Martinoff S, et al. Prognostic value of coronary computed tomographic angiography for prediction of cardiac events in patients with suspected coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009;2(4):404-11.

216. Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Finch M, Phillips CD, Bollampally SR, et al. Carotid artery calcification on CT may independently predict stroke risk. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;186(2):547-52.
217. Hellings WE, Pasterkamp G, Verhoeven BA, De Kleijn DP, De Vries JP, Seldenrijk KA, et al. Gender-associated differences in plaque phenotype of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Vasc Surg.* 2007;45(2):289-96; discussion 96-7.
218. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, et al. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke.* 2002;33(5):1214-9.
219. Wintermark M, Arora S, Tong E, Vittinghoff E, Lau BC, Chien JD, et al. Carotid plaque computed tomography imaging in stroke and nonstroke patients. *Ann Neurol.* 2008;64(2):149-57.
220. Russell DA, Wijeyaratne SM, Gough MJ. Relationship of carotid plaque echomorphology to presenting symptom. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39(2):134-8.
221. Kwee RM. Systematic review on the association between calcification in carotid plaques and clinical ischemic symptoms. *J Vasc Surg.* 2010;51(4):1015-25.
222. Nandalur KR, Hardie AD, Raghavan P, Schipper MJ, Baskurt E, Kramer CM. Composition of the stable carotid plaque: insights from a multidetector computed tomography study of plaque volume. *Stroke.* 2007;38(3):935-40.
223. Li ZY, Howarth S, Tang T, Graves M, J UK-I, Gillard JH. Does calcium deposition play a role in the stability of atheroma? Location may be the key. *Cerebrovasc Dis.* 2007;24(5):452-9.
224. Groen HC, van Walsum T, Rozie S, Klein S, van Gaalen K, Gijzen FJ, et al. Three-dimensional registration of histology of human atherosclerotic carotid plaques to in vivo imaging. *J Biomech.* 2010;43(11):2087-92.
225. Teng Z, Sadat U, Brown AJ, Gillard JH. Plaque hemorrhage in carotid artery disease: pathogenesis, clinical and biomechanical considerations. *J Biomech.* 2014;47(4):847-58.
226. Wahlgren CM, Zheng W, Shaalan W, Tang J, Bassiouny HS. Human carotid plaque calcification and vulnerability. Relationship between degree of plaque calcification, fibrous cap inflammatory gene expression and symptomatology. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(2):193-200.



-
227. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1161-70.
228. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation.* 2008;117(22):2938-48.
229. Samelson EJ, Kiel DP, Broe KE, Zhang Y, Cupples LA, Hannan MT, et al. Metacarpal cortical area and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 2004;159(6):589-95.
230. Jorgensen L, Joakimsen O, Rosvold Berntsen GK, Heuch I, Jacobsen BK. Low bone mineral density is related to echogenic carotid artery plaques: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 2004;160(6):549-56.
231. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(8):1926-31.
232. Lewis JR, Schousboe JT, Lim WH, Wong G, Zhu K, Lim EM, et al. Abdominal Aortic Calcification Identified on Lateral Spine Images From Bone Densitometers Are a Marker of Generalized Atherosclerosis in Elderly Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(1):166-73.
233. Jensky NE, Hyder JA, Allison MA, Wong N, Aboyans V, Blumenthal RS, et al. The association of bone density and calcified atherosclerosis is stronger in women without dyslipidemia: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2702-9.
234. Roman-Garcia P, Carrillo-Lopez N, Fernandez-Martin JL, Naves-Diaz M, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andia JB. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. *Bone.* 2010;46(1):121-8.
235. Stevens JM, Barber CJ, Kerlake R, Broz M, Barter S. Extended use of cranial CT in the evaluation of patients with stroke and transient ischaemic attacks. *Neuroradiology.* 1991;33(3):200-6.
236. MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in CARdiovascular disease [Internet 2013 [Acceso, junio 2016]. Disponible en <http://www.ktl.fi/publications/monica/manual/part4/iv-1.htm - s1-1>

237. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl S:S5-67.
238. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
239. Oates CP, Naylor AR, Hartshorne T, Charles SM, Fail T, Humphries K, et al. Joint recommendations for reporting carotid ultrasound investigations in the United Kingdom. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;37(3):251-61.
240. Rothwell PM, Gutnikov SA, Warlow CP, European Carotid Surgery Trialist's C. Reanalysis of the final results of the European Carotid Surgery Trial. *Stroke.* 2003;34(2):514-23.
241. Wardlaw JM, Lewis S. Carotid stenosis measurement on colour Doppler ultrasound: agreement of ECST, NASCET and CCA methods applied to ultrasound with intra-arterial angiographic stenosis measurement. *Eur J Radiol.* 2005;56(2):205-11.
242. Waaijer A, Weber M, van Leeuwen MS, Kardux J, Veldhuis WB, Lo R, et al. Grading of carotid artery stenosis with multidetector-row CT angiography: visual estimation or caliper measurements? *Eur Radiol.* 2009;19(12):2809-18.
243. Wasserman BA, Astor BC, Sharrett AR, Swingen C, Catellier D. MRI measurements of carotid plaque in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study: methods, reliability and descriptive statistics. *J Magn Reson Imaging.* 2010;31(2):406-15.
244. Tetteroo E, Mali WP, Beek FJ, Verwey JC, van Gijn J. Non-selective digital subtraction angiography in comparison with selective conventional angiography in the diagnosis of carotid artery disease. *Eur J Radiol.* 1995;19(2):73-6.
245. Puchner S, Popovic M, Wolf F, Reiter M, Lammer J, Bucek RA. Multidetector CTA in the quantification of internal carotid artery stenosis: value of different reformation techniques and axial source images compared with selective carotid arteriography. *J Endovasc Ther.* 2009;16(3):336-42.
246. Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare



professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2011;42(2):517-84.

247. Popa RF, Strobescu C, Baroi G, Raza A, Fotea V. Complex ultrasound study of the atherosclerotic plaque. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2013;117(2):424-30.

248. Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL, et al. 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(8):1002-44.

249. Saremi F, Achenbach S. Coronary plaque characterization using CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2015;204(3):W249-60.

250. Rozie S, de Weert TT, de Monye C, Homburg PJ, Tanghe HL, Dippel DW, et al. Atherosclerotic plaque volume and composition in symptomatic carotid arteries assessed with multidetector CT angiography; relationship with severity of stenosis and cardiovascular risk factors. *Eur Radiol*. 2009;19(9):2294-301.

251. Hameeteman K, Zuluaga MA, Freiman M, Joskowicz L, Cuisenaire O, Valencia LF, et al. Evaluation framework for carotid bifurcation lumen segmentation and stenosis grading. *Med Image Anal*. 2011;15(4):477-88.

252. Miralles M, Arrebola M, Bruguer S, Lago A, Lara R. Volumetric assessment of the carotid bifurcation: an alternative concept to stenosis grading. *Ann Vasc Surg*. 2015;29(3):411-8.

253. Zhao X, Underhill HR, Zhao Q, Cai J, Li F, Oikawa M, et al. Discriminating carotid atherosclerotic lesion severity by luminal stenosis and plaque burden: a comparison utilizing high-resolution magnetic resonance imaging at 3.0 Tesla. *Stroke*. 2011;42(2):347-53.

-
254. Wasserman BA. Advanced contrast-enhanced MRI for looking beyond the lumen to predict stroke: building a risk profile for carotid plaque. *Stroke*. 2010;41(10 Suppl):S12-6.
255. Amarenco P, Labreuche J, Lavalley P, Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke*. 2004;35(12):2902-9.
256. Krasinski A, Chiu B, Spence JD, Fenster A, Parraga G. Three-dimensional ultrasound quantification of intensive statin treatment of carotid atherosclerosis. *Ultrasound Med Biol*. 2009;35(11):1763-72.
257. van Prehn J, Muhs BE, Pramanik B, Ollenschleger M, Rockman CB, Cayne NS, et al. Multidimensional characterization of carotid artery stenosis using CT imaging: a comparison with ultrasound grading and peak flow measurement. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008;36(3):267-72.
258. Huang Y, Li W, Dong L, Li R, Wu Y. Effect of statin therapy on the progression of common carotid artery intima-media thickness: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(1):108-21.
259. Glodny B, Helmelt B, Trieb T, Schenk C, Taferner B, Unterholzner V, et al. A method for calcium quantification by means of CT coronary angiography using 64-multidetector CT: very high correlation with Agatston and volume scores. *Eur Radiol*. 2009;19(7):1661-8.
260. Rumberger JA, Kaufman L. A rosetta stone for coronary calcium risk stratification: agatston, volume, and mass scores in 11,490 individuals. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;181(3):743-8.
261. McCollough CH, Ulzheimer S, Halliburton SS, Shanneik K, White RD, Kalender WA. Coronary artery calcium: a multi-institutional, multimanufacturer international standard for quantification at cardiac CT. *Radiology*. 2007;243(2):527-38.
262. Kronmal RA, McClelland RL, Detrano R, Shea S, Lima JA, Cushman M, et al. Risk factors for the progression of coronary artery calcification in asymptomatic subjects: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation*. 2007;115(21):2722-30.



263. Moselewski F, O'Donnell CJ, Achenbach S, Ferencik M, Massaro J, Nguyen A, et al. Calcium concentration of individual coronary calcified plaques as measured by multidetector row computed tomography. *Circulation*. 2005;111(24):3236-41.
264. McKinney AM, Casey SO, Teksam M, Lucato LT, Smith M, Truwit CL, et al. Carotid bifurcation calcium and correlation with percent stenosis of the internal carotid artery on CT angiography. *Neuroradiology*. 2005;47(1):1-9.
265. Budoff MJ, Young R, Lopez VA, Kronmal RA, Nasir K, Blumenthal RS, et al. Progression of coronary calcium and incident coronary heart disease events: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(12):1231-9.
266. van Gils MJ, Bodde MC, Cremers LG, Dippel DW, van der Lugt A. Determinants of calcification growth in atherosclerotic carotid arteries; a serial multi-detector CT angiography study. *Atherosclerosis*. 2013;227(1):95-9.
267. Gopal A, Nasir K, Liu ST, Flores FR, Chen L, Budoff MJ. Coronary calcium progression rates with a zero initial score by electron beam tomography. *Int J Cardiol*. 2007;117(2):227-31.
268. Dalager MG, Bottcher M, Andersen G, Thygesen J, Pedersen EM, Dejbjerg L, et al. Impact of luminal density on plaque classification by CT coronary angiography. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2011;27(4):593-600.
269. 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;47(3):672-7.
270. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):715-23.
271. Wolak T. Osteopontin - a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis*. 2014;236(2):327-37.
272. Goyette J, Yan WX, Yamen E, Chung YM, Lim SY, Hsu K, et al. Pleiotropic roles of S100A12 in coronary atherosclerotic plaque formation and rupture. *J Immunol*. 2009;183(1):593-603.
273. Chen Z, Ichetovkin M, Kurtz M, Zycband E, Kawka D, Woods J, et al. Cholesterol in human atherosclerotic plaque is a marker for underlying disease state and plaque vulnerability. *Lipids Health Dis*. 2010;9:61.

274. Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4246-53.
275. Sinnott B, Syed I, Sevrukov A, Barengolts E. Coronary calcification and osteoporosis in men and postmenopausal women are independent processes associated with aging. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(4):195-202.
276. Hyder JA, Allison MA, Barrett-Connor E, Detrano R, Wong ND, Sirlin C, et al. Bone mineral density and atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, Abdominal Aortic Calcium Study. *Atherosclerosis.* 2010;209(1):283-9.
277. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res.* 2009;104(9):1041-8.
278. Leboy PS. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:14-8.
279. Hsu JJ, Tintut Y, Demer LL. Vitamin D and osteogenic differentiation in the artery wall. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1542-7.
280. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2008;117(4):503-11.
281. Ossareh S. Vascular calcification in chronic kidney disease: mechanisms and clinical implications. *Iran J Kidney Dis.* 2011;5(5):285-99.
282. Ge Q, Ruan CC, Ma Y, Tang XF, Wu QH, Wang JG, et al. Osteopontin regulates macrophage activation and osteoclast formation in hypertensive patients with vascular calcification. *Sci Rep.* 2017;7:40253.
283. Paloian NJ, Leaf EM, Giachelli CM. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification. *Kidney Int.* 2016;89(5):1027-36.
284. Kwon HM, Hong BK, Kang TS, Kwon K, Kim HK, Jang Y, et al. Expression of osteopontin in calcified coronary atherosclerotic plaques. *J Korean Med Sci.* 2000;15(5):485-93.
285. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1610-6.



286. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2006;354(8):821-31.
287. Nybo M, Rasmussen LM. The capability of plasma osteoprotegerin as a predictor of cardiovascular disease: a systematic literature review. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(5):603-8.
288. Hofbauer LC, Schrader J, Niebergall U, Viereck V, Burchert A, Horsch D, et al. Interleukin-4 differentially regulates osteoprotegerin expression and induces calcification in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2006;95(4):708-14.
289. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation.* 2008;117(3):411-20.
290. Giaginis C, Papadopouli A, Zira A, Katsargyris A, Klonaris C, Theocharis S. Correlation of plasma osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of the nuclear factor kappaB ligand (RANKL) levels with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Med Sci Monit.* 2012;18(10):CR597-604.
291. Mogelvang R, Pedersen SH, Flyvbjerg A, Bjerre M, Iversen AZ, Galatius S, et al. Comparison of osteoprotegerin to traditional atherosclerotic risk factors and high-sensitivity C-reactive protein for diagnosis of atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2012;109(4):515-20.
292. Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC, et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3764-8.
293. Rhee EJ, Oh KW, Jung CH, Lee WY, Oh ES, Yun EJ, et al. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the osteoprotegerin gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(6):689-97.
294. Straface G, Biscetti F, Pitocco D, Bertolotti G, Misuraca M, Vincenzoni C, et al. Assessment of the genetic effects of polymorphisms in the osteoprotegerin gene, *TNFRSF11B*, on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability. *Stroke.* 2011;42(11):3022-8.

295. Achenbach S, Ropers D, Pohle K, Leber A, Thilo C, Knez A, et al. Influence of lipid-lowering therapy on the progression of coronary artery calcification: a prospective evaluation. *Circulation*. 2002;106(9):1077-82.



8. ANEXOS

Anexo 8.1

Modelo de consentimiento informado (anverso)

INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del estudio de investigación

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO MINERAL EN LA ATROMATOSIS CAROTÍDEA MEDIANTE ANGIO-TC: PERFIL EVOLUTIVO Y ESTIMACION DEL RIESGO DE ACCIDENTE VASCULAR CEREBRAL

Antecedente y objetivos

La relación entre la calcificación de la placa de arteriosclerosis (AE) y el riesgo posterior de desarrollar accidentes cardiovasculares ha sido sugerida en diversos estudios. Sin embargo, sus resultados, a menudo contradictorios, se han visto limitados por la falta de un método adecuado para su detección y cuantificación. Solo recientemente, la angio-TC ha permitido la identificación y caracterización precisa del calcio en la placa de AE.

El objetivo principal de este estudio consiste en el desarrollo de un modelo para predecir el riesgo de accidente vascular cerebral en función del contenido y distribución del calcio en la placa de AE carotídea.

Procedimientos

Si consiento participar en este estudio me realizarán las siguientes pruebas:

Me harán algunas preguntas relacionadas con mi historial médico y hábitos de vida.

Un Angio-TC* (TAC de la región cervical (cuello)). La exploración dura unos 20 minutos y no es molesta ni requiere ninguna medida complementaria salvo la inyección de un contraste yodado en una vena superficial de la cara anterior del brazo.

En caso de cumplir con las condiciones del protocolo de estudio se repetirá la exploración al cabo de 12 meses para analizar variaciones en las dimensiones de la placa de AE y su contenido de calcio.

Una densitometría ósea para valorar el grado de descalcificación de mis huesos. Esta exploración dura 5-10 min., es absolutamente inocua y no requiere la administración de contraste.

Me extraerán sangre del brazo una sola vez para hacer los análisis pertinentes. La toma de muestras de sangre tiene dos finalidades: determinaciones de laboratorio y obtención de DNA (material genético) para estudiar sus características en un futuro próximo. El material genético solo se utilizará para investigar posibles marcadores relacionados con los procesos de calcificación arterial y progresión de la aterosclerosis carotídea objeto de este proyecto.

Riesgos y Beneficio

En este estudio no existe intervención. No se administrarán fármacos distintos a la medicación habitual del paciente. Por tanto, no existen riesgos asociados ni beneficio directo por la participación en el estudio. Sin embargo, es posible que se obtenga información importante para la detección precoz y/o tratamiento de mi enfermedad en el futuro.

La tomografía computerizada (TC) es un equipo que utiliza rayos X para la exploración del paciente. El tubo de rayos X gira alrededor del cuerpo del paciente, obteniéndose información desde distintos ángulos del cuerpo del paciente. La información se procesa en un ordenador y se obtienen imágenes axiales (secciones) de los tejidos y órganos explorados.

La angiografía-TC es un examen en el que, mediante la inyección de contraste intravenoso, se realiza una exploración con TC para valorar el flujo vascular en vasos arteriales en cualquier localización del organismo. Se obtienen imágenes del sistema vascular de gran calidad, superior a los estudios con RM o ecografía, y puede reemplazar en ocasiones a la arteriografía convencional.

La angiografía-TC puede utilizarse en el cribado de enfermedad arterial pues es segura, más cómoda y mejor tolerada por el paciente que la angiografía por catéter (la inyección de contraste se hace en una vena del antebrazo y no a través de un catéter en la arteria como en la segunda técnica). La inyección de contraste intravenoso conlleva el riesgo de una reacción alérgica que excepcionalmente puede ser grave. Si usted es alérgico al contraste yodado puede realizarse la prueba tomando una medicación previa 24 horas antes.

El contraste yodado utilizado puede dañar el riñón por lo que debe evitarse en pacientes con enfermedad renal o diabetes severa. Es posible que se produzca rotura de la vena periférica utilizada para la inyección del contraste, y este se acumule bajo la piel. Si nota dolor durante la inyección del contraste en el punto de inyección, debe avisar inmediatamente al técnico. Las mujeres deben advertir si están o pueden estar embarazadas.



Anexo 8.2

Modelo de consentimiento informado (reverso)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio de investigación

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO MINERAL EN LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA MEDIANTE ANGIO-TC: PERFIL EVOLUTIVO Y ESTIMACION DEL RIESGO DE ACCIDENTE VASCULAR CEREBRAL

Investigador principal

Dr. Manuel Miralles Hernández. Servicio de Cirugía Vasculardel Hospital Universitario La Fe. Valencia

Confidencialidad

Le garantizamos que sus datos serán tratados con absoluta confidencialidad según la Ley Orgánica que regula la confidencialidad de los datos informatizados (Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre sobre protección de datos de carácter personal), y que serán utilizados exclusivamente con finalidades de esta investigación científica. Usted tiene derecho a pedirnos en cualquier momento que eliminemos de los registros sus datos personales y a recibir los resultados de las exploraciones que se le hacen. Si no quiere que se los enviemos o quiere que eliminemos los datos personales de los registros, nos lo tendría que comunicar (puede hacerlo en cualquier momento a los teléfonos que le indicamos más abajo).

Preguntas

El Dr. _____, investigador colaborador en este estudio, ha discutido esta información conmigo y se ha ofrecido a responder a mis preguntas. En caso necesario puedo contactar con un miembro del equipo investigador en los siguientes teléfonos: 93 2483223 .

Derecho a rehusar o abandonar

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonar en cualquier momento sin afectar por ello mi atención médica.

Consentimiento

Para llevar a término el proyecto que le hemos expuesto, las disposiciones legales vigentes (Ley del Medicamento 25/1990 y real Decreto 223/2004) aconsejan que le pidamos su autorización.

El Sr/La Sra:ha sido informado/a de las finalidades del presente estudio, ha podido hacer las preguntas que considera oportunas y acepta que los investigadores del estudio DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO MINERAL EN LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA MEDIANTE ANGIO-TC: PERFIL EVOLUTIVO Y ESTIMACION DEL RIESGO DE ACCIDENTE VASCULAR CEREBRAL conserven el material biológico (suero) para futuros estudios. **El material biológico (suero) solo se utilizará para investigar posibles marcadores relacionados con los procesos de calcificación arterial y progresión de la aterosclerosis carotídea objeto de este proyecto.**

Valencia a, de de 200....

El interesado

El investigador

El Sr/La Sra: acepta que los investigadores del estudio DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO MINERAL EN LA ATEROMATOSIS CAROTÍDEA MEDIANTE ANGIO-TC: PERFIL EVOLUTIVO Y ESTIMACION DEL RIESGO DE ACCIDENTE VASCULAR CEREBRAL conserven el material genético (DNA leucocitario) para futuros estudios. **El material genético solo se utilizará para investigar posibles marcadores relacionados con los procesos de calcificación arterial y progresión de la aterosclerosis carotídea objeto de este proyecto.**

El interesado

El investigador

Anexo 8.3

Documento de aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del H.U. "La Fe"

GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA DE SANITAT

2006/0024

LIBRE
de

06-00024-2I

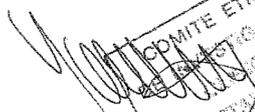
AV AGÈNCIA
VALENCIANA
DE SALUT

HOSPITAL UNIVERSITARI "LA FE"

El comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Fé de Valencia, reunido en su sesión de fecha 29 de agosto de 2006, acuerda **APROBAR** el proyecto de investigación titulado: Cuantificación y caracterización del calcio mineral en la ateromatosis carotídea mediante angio-TC: estimación del riesgo de accidente vascular cerebral. **Investigador Principal** Dr. M. Miralles de Angiología y Cirugía Vasculaar.

Valencia a 29 de agosto de 2006

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA


COMITE ETICO
de INVESTIGACION
CLINICA
HOSPITAL "LA FE"
VALENCIA

Fdo Dr. J. Mentalar Salcedo



Anexo 8.4

Documento de aprobación de la Comisión de Investigación Clínica del H.U. La Fe

2006/0029

CEIC
25-04-06
(actualizaciones)
Aprobado → 29-8-2006

Comisión de Investigación



**AGÈNCIA
VALENCIANA
DE SALUT**

HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE



Seamos un Hospital
**LIBRE
de
HUMO**

D. JOSE VTE. CASTELL RIPOLL, Presidente de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario "La Fe" de Valencia,

INFORMA: Que el Proyecto de Investigación titulado: *"Cuantificación y caracterización del calcio mineral en la aterosclerosis carotídea mediante angio-TC: estimación del riesgo de accidente vascular cerebral"*, que presenta el Investigador **Dr. Manuel Miralles Hernández**, del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital La Fe, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse positivamente en cuanto a su viabilidad.

COMISION DE INVESTIGACIÓN

- Aprobado por la Comisión Permanente de Investigación (fecha 28/03/2006)
- Ratificado en acta n.º 3/06 de fecha 14-7-2006

Valencia a 28 de Marzo de 2006



Anexo 8.5

Publicación correspondiente a Estudio piloto.

Eur J Vasc Endovasc Surg 32, 561–567 (2006)

doi:10.1016/j.ejvs.2006.02.019, available online at <http://www.sciencedirect.com> on  ScienceDirect

Quantification and Characterization of Carotid Calcium with Multi-detector CT-angiography

M. Miralles,^{1*} J. Merino,¹ M. Busto,² X. Perich,² C. Barranco³ and F. Vidal-Barraquer¹

¹Departments of Vascular Surgery, ²Radiology, and ³Pathology, Universidad Autonoma de Barcelona, Hospital Universitario del Mar, Passeig Marítim 27-29, 08003 Barcelona, Spain

Objective. The aim of this study was to assess the accuracy of CT-angiography for identification and measurement of calcification of carotid atherosclerotic plaques and to characterise the content and distribution pattern of mineral calcium (hydroxyapatite, Ca) in carotid bifurcations and investigate its relationship with neurological symptoms.

Methods. Twenty-six patients with ICA stenosis >60% (13 symptomatic, 13 asymptomatic) were selected for study. Ca was estimated from the weight of the ashed remnants of carotid endarterectomy (CEA) specimens in 11 patients. Calcium content (calcification volume (mm³), CV), and average calcium density (Hounsfield units (HU), CD), were determined by CT-angiography. The distribution pattern of calcium within the lesion (base (posterior), shoulder or luminal surface) was assessed in all cases.

Results. CT-derived estimation of CV and Ca mass (modified Agatston Score, (mAS) = CV × CD) showed a good correlation with its direct measurement in CEA specimens ($r = 0.911$ and 0.993 respectively, $p < 0.005$). Asymptomatic patients with ICA stenosis >60% showed statistically significant higher content of Ca than those who were symptomatic (mAS: 122.6 ± 138.0 HU mm³ vs 42.8 ± 59.1 HU mm³, $p = 0.04$). Calcification on the surface of the plaque was observed more commonly in asymptomatic patients (9/12 vs 3/15, $p = 0.006$). Non-calcified or plaques with posterior calcification were 12 times more likely to be symptomatic (OR: 12, 95%CI 1.5–91.1, $p = 0.021$).

Conclusions. CT-angiography permits the reliable quantification of calcification of carotid plaques. A lower content of calcium in carotid plaques, as well as its distribution in the base of the lesion, was associated with a greater prevalence of neurological symptoms. These parameters may be useful to identify those patients at higher risk of stroke.

Keywords: Carotid; Calcification; Risk factors; Stroke; Computed tomography.

Introduction

A relationship between calcification of the atherosclerotic plaque and the subsequent risk of developing cardiovascular events has been suggested in several studies.^{1,2} However, the lack of a reliable method for *in vivo* detecting and quantifying calcium in the arterial wall has precluded evaluation of calcium content in cross-sectional and follow-up studies. Calcification of atherosclerotic plaques has been considered to be a major drawback for imaging carotid artery, being responsible for the posterior shadowing in duplex scanning and artifacts that preclude correct interpretation of standard angiograms. Calcification is not resolved on magnetic resonance imaging (MRI). Only recently,

electron-beam computed tomography (EBCT) and multi-detector computed tomography (MDCT) have permitted the accurate identification and measurement of mineral calcium (hydroxyapatite, Ca) in atherosclerotic plaques.

Several scoring systems have been suggested for CT-based estimation of calcification from serial sections (Agatston score), or based on 3D volumetric reconstructions with multiple detectors or helical CT. The accuracy of these scoring methods and their relationship with the subsequent risk of developing coronary ischaemic events has been assessed.^{3,4} However, there is less information about reliability and predictive value of assessing the risk of stroke associated with atherosclerotic lesions of the extracranial carotid artery.

The aim of this study of carotid arteries was: (i) To assess the accuracy of CT-angiography to identify and measure calcification of atherosclerotic plaques; (ii) To characterise the content and distribution pattern of calcification at the carotid bifurcation and investigate its relationship with neurological symptoms.

*Corresponding author. Manuel Miralles, PhD, C/Cronista Carreres 13; pta 25, 46003 Valencia, Spain.
E-mail address: mirallesm@telefonica.net



Volumetric Assessment of the Carotid Bifurcation: An Alternative Concept to Stenosis Grading

Manuel Miralles,¹ Manel Arrébola,¹ Sara Bruquer,² Aida Lago,³ and Raúl Lara,¹ Valencia, Spain

Background: To design a volumetric method for the assessment of carotid atheromatosis (CA) based on computed tomography (CT) angiography and three-dimensional (3D) reconstructions; to analyze the accuracy and optimal threshold values to differentiate between equivalent degrees of severity by duplex scanning and CT angiography (two-dimensional maximum intensity projection [2D MIP]; internal carotid artery stenosis [ICS] <50%; ICS >50%); and to assess the method's suitability to detect progression of CA.

Methods: *Design:* suitability and accuracy of a new diagnostic method. *Population:* 90 carotid bifurcations (45 patients) were assessed with duplex scanning and CT angiography, and reevaluated after 12 ± 2 months follow-up. *Determinations:* Assessment of internal carotid artery (ICA) stenosis degree with duplex scanning and 2D MIP CT angiography projections. Volumetric assessment of carotid bifurcation by CT angiography (contrast volume [mm³] and density [Hounsfield units, H.U.] between 2-cm below and 1-cm above the anatomic bifurcation of the carotid artery [BifV], and its ratio with 1-cm segment of the common carotid artery [CCV]). *Statistical analysis:* descriptive statistics; intraobserver and interobserver agreement (Bland–Altman plot and intraclass correlation coefficient [ICC], accuracy of 3D volumetry and duplex scanning as referred to MIP 2D CT angiography as gold standard: sensitivity (Sens), specificity (Sp), kappa index, and receiver operating characteristic curves (ROCs). **Results:** Estimation of MIP 2D images (CT angiography) confirmed the findings of duplex scanning in 23 of 30 ICS <50% and 48 of 53 ICS >50% (Sens, 0.91; Sp, 0.77% kappa = 0.68). Three-dimensional volumetric assessment of carotid bifurcation showed an intraobserver and interobserver agreement with an ICC of 0.96 (95% confidence interval [CI], 0.904–0.985) and 0.94 (95% CI, 0.822–0.977), respectively. The BifV-to-CCV ratio was 5.2 ± 1.8 in the ICS <50% group versus 3.8 ± 1.3 in the ICS >50% group (P = 0.001). The optimal cutoff point of the BifV-to-CCV relationship was identified from the ROC curve in 4.1 (Sens, 0.75; Sp, 0.75; kappa, 0.46). At 12 months, a decrease of the average BifV with regard to the baseline value (475.45 [155.6] mm³ × H.U. vs. 501.3 [171.9] mm³ × H.U.; P = 0.04) was observed. CA progression was detected in 32 bifurcations (14 ICS <50%; 18 ICS > 50%), with a reduced bifurcation volume of 137.8 (71.4) mm³ × H.U.; P < 0.001.

Conclusions: Volumetric assessment of carotid bifurcation is a new concept based on assessing plaque burden rather than its hemodynamic effect or maximum stenosis; thus, justifying its moderate accuracy with regard to ICS conventional ICA grading based on biplanar images. This method can be especially useful in plaque progression studies given its accuracy to detect minor changes in the arterial lumen.

Funding: This study was partly funded by a grant from the Health Research Fund (Fondo de Investigación Sanitaria) PI07/0623.

¹Angiology and Vascular Surgery Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain.

²Radiology Department, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain.

³Neurology Department, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain.

Correspondence to: Manuel Miralles, PhD, Unidad de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Universitari i Politènic La Fe, Bulevar Sur s/n, Valencia 46026, Spain; E-mail: miralles_manher@gva.es

Ann Vasc Surg 2015; 29: 411–418

<http://dx.doi.org/10.1016/j.avsg.2014.11.005>

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Manuscript received: June 11, 2014; manuscript accepted: November 4, 2014; published online: January 13, 2015.