



Universitat de Lleida

## Característiques diferencials de l'aterosclerosi subclínica en la diabetis mellitus

Esther Rubinat Arnaldo

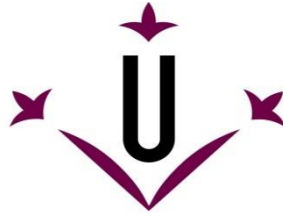
Dipòsit Legal: L.885-2015

<http://hdl.handle.net/10803/308132>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

Memòria de Tesi per optar al grau de Doctora per la Universitat de Lleida presentat per

**Esther Rubinat Arnaldo**

**CARACTERÍSTIQUES  
DIFERENCIALS DE  
L'ATEROSCLEROSI SUBCLÍNICA  
EN LA DIABETIS MELLITUS**

Director:

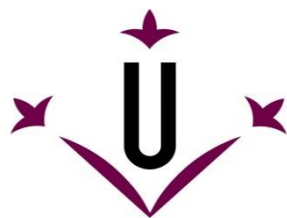
Dídac Mauricio Puente

Directora:

Elvira Fernández Giráldez

Maig 2015, Lleida

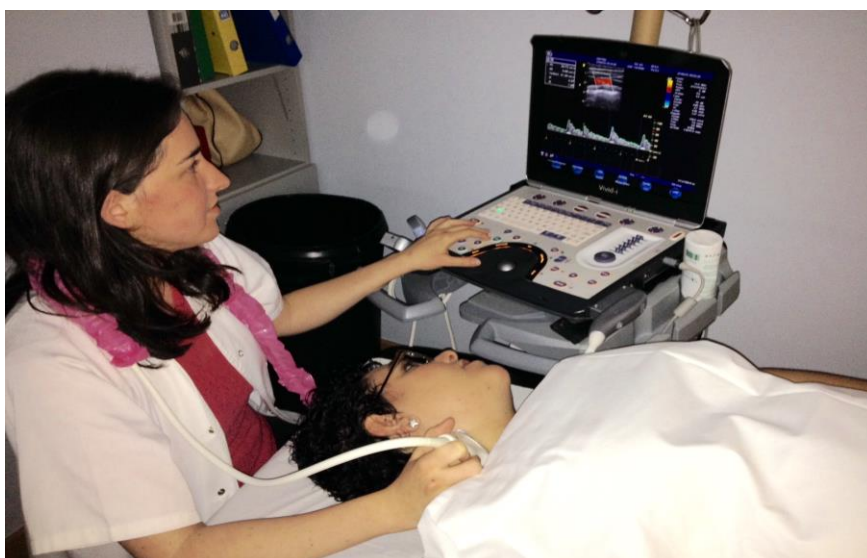




**Universitat de Lleida**

# **CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS DE L'ATEROSCLEROSI SUBCLÍNICA EN LA DIABETIS MELLITUS**

**Esther Rubinat Arnaldo**







Universitat de Lleida

## **Informe idoneïtat de la tesi doctoral**

El Dr. Dídac Mauricio Puente, Cap de Servei en funcions d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

i

la Dra. Elvira Fernández Giráldez, Cap de Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova i Professora titular a la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida

en qualitat de co-directors,

### **CERTIFIQUEN**

que la tesi doctoral titulada "Característiques diferencials de l'aterosclerosi subclínica en la diabetis mellitus", ha estat realitzada al Institut de Recerca Biomèdica de Lleida i tutelada en el Departament de Medicina de la Universitat de Lleida.

Comfirmem que la tesi realitzada per Esther Rubinat Arnaldo reuneix totes les condicions requerides per la legislació vigent i l'originalitat i qualitat científica per a poder ser presentada i defensada amb l'objectiu d'optar al grau de Doctor.

I per tal que així consti i als efectes oportuns, signem aquest certificat.

Lleida, 25 de maig del 2015

Dr. Dídac Mauricio Puente

Dra. Elvira Fernández Giráldez

Esther Rubinat Arnaldo. Característiques diferencials de l'aterosclerosi subclínica en la diabetis mellitus. Tesi Doctoral. © Maig 2015.

A la meva filla, Eva.





“La Infermeria és un art i si es pretén que sigui un art, requereix d’una devoció tan exclusiva, una preparació tan dura, com el treball d’un pintor o d’un escultor, però com es pot comparar la tela morta o el fred marbre amb haver de treballar amb el cos viu, el temple de l’esperit de Déu? És una de les Belles Arts; quasi diria, la més bella de totes les Belles Arts”

Florence Nightingale.

## AGRAÏMENTS

Aquesta tesi és el fruit de moltes hores de treball, dedicació i esforç de totes les persones que m’heu acompanyat en aquesta aventura, mantenint-me ferma en el meu propòsit.

En primer lloc agrair a les persones més importants de la meva vida, la meva família. Als meus pares, Josep i Núria per ser uns lluitadors incansables, per viure pels vostres fills, per empènyer-me sempre endavant. Aquesta tesi és vostra. Gràcies eternes. A la meva padrina Maria, que és la persona més dolça i generosa que coneixeré, sé que estàs orgullosa de mi. Als meus altres padrins, que ja no hi són, però que van veure començar aquesta història, sé que des d’allà ho esteu celebrant. Al meu germà, al qui li dec moltes hores, jo a Barcelona i tu a Lleida i ara al revés. En tot el que faig d’alguna forma tu sempre hi ets present. Gràcies Bro. Al Carlos, el meu marit, perquè són molts anys junts, estimant-nos i gaudint del camí plegats. Tu m’has donat el millor regal, la nostra princesa Eva, llum i raó de ser. Sense vosaltres jo no sóc. Us estimo infinit. Als meus sogres, Ramon i Júlia, per acollir-me com una filla, i també al Victor, el meu cunyat. A l’Eduard, a l’Anna i a l’Eva, gràcies per ser uns cosins genials. A la Mireia, la meva amiga de l’ànima i la meva germana. Som molt afortunades.

Al Dr. Dídac Mauricio, director, “jefe”, pare científic i bon amic. De la teva mà vaig deixar Barcelona per tornar a la ciutat que m’ha vist néixer. Sense la teva confiança, consells, paciència, motivació i amor per la ciència, aquesta tesi mai hagués estat possible. La teva capacitat de treball, lideratge, sentit de l’humor i fidelitat al teu equip fan que treballar al teu costat sigui tot un plaer. Espero seguir molts més anys treballant amb tan bona companyia. Gràcies infinites.

A la Dra. Elvira Fernández, codirectora i líder incansable. Has format un gran servei, la UDETMA, integrat per un equip de qualitat humana i professional excel·lent. Mil gràcies per confiar en mi i deixar que en formi part.

A la Núria Alcubierre, pel dia a dia, per l'amistat i perquè l'una a l'altra ens hem motivat per arribar al mateix objectiu sense morir en l'intent. A la Lola Martínez, Minerva Granado i Dra. Esmeralda Castelblanco, hem compartit espai de treball i m'heu fet riure a diari. A la Tere Vidal, la Virtu Maria, la Dra. Àngels Betriu, la Dra. Victoria Arcidiacono, la Meritxell Soria, la Tere Molí, l'Eva Castro, la Elisabet Samsó, la Mari Valle i a tot l'equip de l'UDETMA que m'han facilitat el treball de camp i m'han adoptat dins l'ampli món de l'ecografia. També al Servei d'Endocrinologia i Nutrició, perquè sou genials i a més compartim l'enllorança d'un "jefe" peculiar i insubstituïble. Gràcies també al Dr. Jordi Sanahuja, per ajudar-me a entendre la complexitat del cervell i a la Dra. Traveset, amb qui vam passar de compartir pacients a compartir una molt bona amistat, ets la meva oftalmòloga preferida. A la Dra. Mireia Falguera, Dra. M Belén Vilanova i a la Cristina Cebrian, per formar un gran equip que sempre aconseguia que les tardes de treball al CAP Mollerussa fossin divertides, vam fer un gran treball juntes. Gràcies també al Josep Ramon Marsal, al Dr. Joan Valls i a la Dra. Montse Martínez per l'estadística; a l'Andreu Moix per les correccions lingüístiques i a la Glòria Sol per l'abstract. A la Dra. Àngels Molló, per donar-me ànims i per confiar en mi per a nous projectes. Gràcies també a tots els pacients que han participat altruïstament en aquest treball, doncs la millora de la seva qualitat de vida és el que impulsa i dóna sentit a la recerca científica.

No em vull deixar d'anomenar algunes de les persones que heu influït positivament en la meua carrera vital i professional: Josep Palau, per tants anys d'amistat i perquè els matins sense un cafè amb tu serien molt més durs; a tota la meua tropa de Golmés, "Lo Fato", pels bons moments compartits any darrere any. A la Isabel Sánchez i al Carlos Ramos, companys inseparables de carrera i de vida. Als amics del Centre d'Alt Rendiment de Sant Cugat, per transmetre'm la capacitat de treball i sacrifici. A tot l'equip d'Urgències de l'Hospital del Mar, perquè compartim la cicatriu dels que han fet equilibris sobre el precipici. Al Dr. Josep M. Cubero i a la Toñi Peláez, grans amics i companys de fatigues a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. A la Dra. Adela Zabalegui, per transmetrem la motivació necessària per iniciar aquesta aventura que avui dono per conclosa amb la il·lusió del que anhela una nova meta.

Tots vosaltres heu aportat el vostre granet d'alegria, d'amistat, d'amor i de ciència, tant a la meua vida com a la història d'aquesta tesi. Eternament agraïda.

## RESUM

---

### CONTEXT

La diabetis mellitus (DM) és un factor de risc important en el desenvolupament de l'aterosclerosi, principal causa d'aparició de la malaltia cardiovascular i de mortalitat en aquests pacients. La detecció precoç d'aterosclerosi subclínica mitjançant ecografia carotídia, avaluant la gruix íntima-mitja (GIM) i la presència de placa d'ateroma, és un mètode vàlid i fiable. No obstant això, el procés arterioscleròtic s'inicia abans de la detecció d'un augment anormal en el GIM. Els vasa vasorum (VV) són un plexe de microvasos fisiològicament presents a la capa adventícia de les grans i mitjanes artèries, que subministren oxígen i nutrients a la part externa de la paret arterial. La hiperplàsia dels VV acompanya la fase inicial d'inflamació i a mida que avança el procés ateromatós apareixen nous microvasos que s'estenen des de l'adventícia a la capa íntima i mitja, produint una neovascularització anormal en aquestes zones. Fins a l'actualitat, els estudis que s'han dut a terme s'han focalitzat en la implicació de la neovascularització en la inestabilitat de la placa d'ateroma. Nosaltres suggerim que els microvasos de les grans artèries són una diana de la microangiopatia diabètica similar a la d'altres localitzacions ben reconegudes com la retina, el glomèrul renal, i el nervi perifèric. La situació d'hiperglucèmia crònica, característica de la diabetis, afecta la microcirculació dels òrgans diana clàssics. Plantegem, doncs, que la hiperglucèmia origina també canvis microangiopàtics en altres territoris, com en els VV de les grans artèries i aquest podria ser un dels factors que explica, almenys en part, les característiques diferencials en l'aterosclerosi diabètica. D'aquesta manera, la microangiopatia de la paret de les grans artèries pot esdevenir el substrat per a una progressió més ràpida i greu de l'aterosclerosi, concebut així que els pacients amb complicacions microangiopàtiques també presentarien una microangiopatia dels VV, amb signes d'angiogènesi incrementada en la paret de les seves grans artèries.

El present treball pretén, en primer lloc, analitzar la prevalença d'aterosclerosi carotídia subclínica en una població amb DM tipus 2 respecte a un grup control sense diabetis, mesurant GIM i presència de placa. Seguidament, es va un pas més enllà en el diagnòstic precoç d'ateromatosis en fases molt inicials de disfunció endotelial, desenvolupant i estandaritzant un nou mètode, que pugui ser vàlid, fiable i reproduïble, de quantificació de la densitat dels VV adventicis en l'artèria caròtida comú mitjançant

ecografia amb contrast, primer en un grup de població sense factors de risc cardiovascular per tal d'establir les mesures fisiològiques de senyal VV i, posteriorment, es planteja la caracterització d'aquest senyal en un grup de pacients amb DM tipus 1 amb i sense retinopatia diabètica.

## **MÈTODES**

En l'estudi d'ateromatosis subclínica en la DM2 es va utilitzar un disseny de casos i controls, conduït per professionals infermers, que incloïa 187 pacients amb diabetis mellitus tipus 2 aparellats per edat i sexe amb 187 pacients sense diabetis. Es van tenir en compte variables clíniques i les derivades de l'ecografia, GIM i presència de placa.

En l'estudi de la densitat fisiològica dels VV adventicis de la caròtida comú es va dissenyar un mètode de quantificació del senyal VV mitjançant ecografia amb contrast que va ser avaluat en 65 voluntaris sense factors de risc cardiovascular. En aquest estudi, es descriu el desenvolupament del mètode emprat per a l'adquisició de les imatges i per a la seva lectura quantitativa.

Posteriorment, una vegada validat el mètode de quantificació de la senyal VV, es va aplicar per avaluar el senyal de VV en la caròtida comú de pacients amb diabetis mellitus tipus 1 amb i sense retinopatia diabètica. Es dissenyà un estudi transversal en el que es van incloure 113 pacients amb DM tipus 1, 60 amb i 53 sense retinopatia, tots lliures de malaltia cardiovascular (MCV) i un grup control integrat per 78 subjectes sense factors de risc cardiovasculars (CV).

## **RESULTATS**

El GIM i la freqüència de plaques es trobaven significativament incrementats en els pacients amb tipus 2 respecte al grup control, essent superiors en homes que en dones, i augmentant progressivament amb l'edat. En l'anàlisi multivariant, el GIM s'associava significativament amb diabetis, edat, sexe i pressió arterial sistòlica. No obstant, la presència de placa, que inicialment mostrava associació amb diabetis, edat, perímetre de cintura, pressió arterial sistòlica i dislipèmia, després d'ajustar el model per altres variables només l'edat i el perímetre de cintura mantenien significació positiva.

En subjectes sense factors de risc cardiovascular, el senyal de VV adventici en la comú carotídia esquerra correlacionava amb el GIM en el mateix territori i també amb

l'edat. Aquesta correlació no es va trobar per a la caròtida dreta, ni tampoc per als valors mitjans entre dreta i esquerra. Els paràmetres bioquímics i antropomètrics analitzats (triglicèrids, proteïna C reactiva, pressió arterial sistòlica i diastòlica, perímetre de cintura i índex de massa corporal) tampoc van mostrar correlació amb el senyal VV ni de caròtida dreta ni tampoc de caròtida esquerra.

Els pacients amb DM tipus 1 mostraren un major senyal de VV que els subjectes no diabètics, i aquestes diferències es mantenien significatives després d'ajustar el model per factors cardiovasculars de confusió. No es van trobar diferències significatives entre el senyal VV o el GIM entre els pacients diabètics amb i sense retinopatia.

## **CONCLUSIONS**

Els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 presenten major prevalença de malaltia ateromatosa subclínica que els subjectes sense diabetis mellitus.

El rol dels professionals de la infermeria és essencial en la prevenció i promoció de la salut, mitjançant la realització dels procediments ecogràfics, la identificació dels factors de risc cardiovasculars i l'educació per a la salut.

S'ha desenvolupat i estandarditzat un mètode ecogràfic de quantificació del senyal de vasa vasorum de l'adventícia de la caròtida comú que és vàlid, fiable i reproducible.

L'avaluació del senyal de vasa vasorum en l'adventícia de l'artèria caròtida comú pot ser un nou marcador per a l'exploració i monitorització del procés ateroscleròtic.

Els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 presenten major senyal de vasa vasorum que aquells que no tenen diabetis, suggerint que la paret de les grans artèries es pot considerar també una diana de la microangiopatia diabètica.

No s'ha pogut demostrar una associació entre el senyal de vasa vasorum i la presència de retinopatia diabètica en els pacients amb diabetis mellitus tipus 1.



## RESUMEN

---

### CONTEXTO

La diabetes mellitus (DM) es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la aterosclerosis, principal causa de aparición de la enfermedad cardiovascular y de mortalidad en estos pacientes. La detección precoz de aterosclerosis subclínica mediante ecografía carotídea, midiendo el grosor intima-media (GIM) y la presencia de placa de ateroma, es un método válido y fiable. No obstante, el proceso aterosclerótico se inicia antes de la detección de un aumento anormal en el GIM. Los vasa vasorum (VV) son un conjunto de microvasos fisiológicamente presentes en la capa adventicia de las grandes y medianas arterias, que suministra oxígeno y nutrientes a la parte externa de la pared arterial. La hiperplasia de los VV acompaña la fase inicial de inflamación y a medida que avanza el proceso ateromatoso aparecen nuevos microvasos que se extienden desde la adventicia a la capa intima y media, produciendo una neovascularización anormal en estas zonas. Hasta la actualidad, los estudios que se han llevado a cabo se han focalizado en la implicación de la neovascularización en la inestabilidad de la placa de ateroma. Nosotros sugerimos que los microvasos de las grandes arterias son una diana de la microangiopatía diabética similar al de otras localizaciones bien reconocidas como la retina, el glomérulo renal y el nervio periférico. La situación de hiperglucemia crónica, característica de la diabetes, afecta la microcirculación de los órganos diana clásicos. Planteamos pues, que la hiperglucemia también origina los cambios microangiopáticos en otros territorios, como en los VV de las grandes arterias y este podría ser uno de los factores que explica, mínimo en parte, las características diferenciales en la aterosclerosis diabética. De esta manera, la microangiopatía de la pared de las grandes arterias puede ser el sustrato para una progresión más rápida y grave de la aterosclerosis, concibiendo así que los sujetos con complicaciones microangiopáticas también presentarían una microangiopatía de los VV, con signos de angiogénesis incrementada en la pared de sus grandes arterias.

El presente trabajo pretende, en primer lugar, analizar la prevalencia de aterosclerosis carotídea subclínica en una población con DM tipo 2 respecto a un grupo control sin diabetes, midiendo GIM y presencia de placa. Seguidamente, se va un paso más allá en el diagnóstico precoz de ateromatosis en fases muy iniciales de disfunción endotelial, desarrollando y estandarizando un nuevo método, que pueda ser válido, fiable y reproducible, de cuantificación de la densidad de los VV adventicios en la arteria



carótida común mediante ecografía con contraste, primero en un grupo de población sin factores de riesgo cardiovascular con el fin de establecer las medidas fisiológicas de señal VV y posteriormente, se plantea la caracterización de este señal en un grupo de pacientes con DM tipo 1 con y sin retinopatía diabética.

## **MÉTODOS**

En el estudio de ateromatosis subclínica en DM2 se utilizó un diseño de casos y controles, conducido por profesionales enfermeros, que incluía 187 pacientes con diabetes apareados por edad y sexo con 187 pacientes sin diabetes. Se tuvieron en cuenta variables clínicas y las derivadas de la ecografía, GIM y presencia de placa.

En el estudio de la densidad fisiológica de los VV adventicios de la carótida común se diseñó un método de cuantificación de la señal VV mediante ecografía con contraste que fue evaluado en 65 voluntarios sin factores de riesgo cardiovascular. En este estudio se describe el desarrollo del método utilizado para la adquisición de las imágenes y para su lectura cuantitativa.

Posteriormente, una vez validado el método de cuantificación de la señal VV, se aplicó para evaluar la señal de VV en la carótida común de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 con y sin retinopatía diabética. Se diseñó un estudio transversal en el que se incluyeron 113 pacientes con DM tipo 1, 60 con i 53 sin retinopatía, todos libres de enfermedad cardiovascular (MCV) y un grupo control integrado por 78 sujetos sin factores de riesgo cardiovascular (CV).

## **RESULTADOS**

El GIM y la frecuencia de placas se encontraban significativamente incrementados en los DM tipo 2 respecto al grupo control, siendo superiores en hombres que en mujeres, y aumentando progresivamente con la edad. En el análisis multivariante, el GIM se asociaba significativamente con la diabetes, edad, sexo y tensión arterial sistólica. No obstante, la presencia de placa, que inicialmente mostraba asociación con diabetes, edad, perímetro de cintura, tensión arterial sistólica y dislipemia, después de ajustar el modelo por otras variables tan solo la edad y el perímetro de cintura mantuvieron significación positiva.

En los sujetos sin factores de riesgo cardiovascular, la señal de VV adventicio en la común carotidea izquierda correlacionaba con el GIM en el mismo territorio y también con la edad. Esta correlación no se encontró para la carótida derecha ni tampoco para los valores medios entre derecha e izquierda. Los parámetros bioquímicos y antropométricos analizados (triglicéridos, proteína C reactiva, tensión arterial sistólica y diastólica, perímetro de cintura e índice de masa corporal) tampoco mostraron correlación con la señal VV, ni de carótida derecha ni tampoco de carótida izquierda.

Los pacientes con DM tipo 1 mostraron mayor señal de VV que los sujetos no diabéticos, y estas diferencias se mantenían significativas después de ajustar el modelo por otros factores cardiovasculares de confusión. No se encontraron diferencias significativas entre la señal VV o el GIM entre los pacientes diabéticos con y sin retinopatía.

## **CONCLUSIONES**

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan mayor prevalencia de enfermedad ateromatosa subclínica que los sujetos sin diabetes mellitus.

El rol de los profesionales de la enfermería es esencial en la prevención y promoción de la salud, mediante la realización de procedimientos ecográficos, la identificación de los factores de riesgo cardiovasculares y la educación para la salud.

Se ha desarrollado y estandarizado un método ecográfico de cuantificación de la señal de vasa vasorum de la adventicia de la carótida común que es válido, fiable y reproducible.

La evaluación de la señal de vasa vasorum en la adventicia carotidea puede ser un nuevo marcador para la exploración y monitorización del proceso aterosclerótico.

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 presentan mayor señal de vasa vasorum que aquellos que no tienen diabetes, sugiriendo que la pared de las grandes arterias se puede considerar también una diana de la microangiopatía diabética.

No se ha podido demostrar una asociación entre la señal de vasa vasorum y la presencia de retinopatía diabética en los pacientes con diabetes mellitus tipo 1.



## **ABSTRACT**

---

### **BACKGROUND**

Diabetes mellitus (DM) is a major risk factor in the development of atherosclerosis, the main cause of developing cardiovascular disease and mortality in those patients. Early detection of subclinical atherosclerosis by carotid ultrasound, assessing the intima-media thickness (IMT) and the presence of atherosclerotic plaque, is a reliable and valid method. However, the atherosclerotic process begins before the detection of an abnormal increase in IMT. The vasa vasorum (VV) are a plexus of microvessels physiologically present in the adventitious layer of medium and large arteries, which supply oxygen and nutrients to the outer arterial wall. The hyperplasia of VV accompanies the initial stage of inflammation and as soon as the atheromatous process develops, new microvessels appear ranging from the intima-media adventitious layer, producing an abnormal neovascularization in these areas. Until now, studies that have been conducted, have focused on the involvement of neovascularization in atherosclerotic plaque instability. We suggest that the microvessels of the major arteries are a target of diabetic microangiopathy similar to other well-known locations such as the retina, the glomerulus, and peripheral nerve. The situation of chronic hyperglycemia, characteristic of diabetes, affects the microcirculation of the targeted classic organs. We suggest, however, that hyperglycemia originates microangiopathic changes in other areas, such as VV in the large arteries and this could be one factor that explains, at least in part, the differential characteristics in diabetic atherosclerosis. Thus, the wall microangiopathy of large arteries can become the substrate for a more severe and faster progression of atherosclerosis, considering that the subjects with microangiopathic complications would also present a VV microangiopathy with signs of increased angiogenesis in the wall of his major arteries.

The present study aims, firstly, to analyze the prevalence of subclinical carotid atherosclerosis in people with type 2 diabetes compared to a control group without diabetes, measuring IMT and presence of plaque. Then we took a step further in the early diagnosis of atheromatosis in very early stages of endothelial dysfunction, developing and standardizing a new method that can be valid, reliable, and reproducible which quantifies the density of VV adventitious in the common carotid artery through an ultrasound contrast, first in a group of people without cardiovascular risk factors in order

to establish physiological measures of VV signal and then a characterization of this signal in a group of patients with type 1 DM with and without diabetic retinopathy.

## **METHODS**

In the study of subclinical atheromatosis in DM2 we used a case-control design, led by professional nurses, which included 187 diabetes patients matched for age and sex with 187 patients without diabetes. It took into account clinical variables and the ones derived from the ultrasound, the IMT and the presence of plaque.

In the study of physiological density of adventitious VV in the common carotid, a method for quantifying VV signal ultrasound contrast was designed and evaluated to 65 volunteers with no cardiovascular risk factors. This study describes the development of the method used for the acquisition of the images and for quantitative reading.

Later, once the method for quantifying signal VV was validated, we used this method to evaluate the signal VV in common carotid patients with type 1 diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy. We designed a cross-sectional study that included 113 patients with type 1 DM, 60 with and 53 without retinopathy, all free of cardiovascular disease (MCV) and a control group consisting of 78 subjects without cardiovascular risk factors (CV).

## **RESULTS**

The GIM and the frequency of plaques were significantly increased in type 2 DM compared to the control group, being higher in men than in women and increased progressively with age. On multivariate analysis, the GIM was significantly associated with diabetes, age, sex, and systolic blood pressure. However, the presence of plaque, which initially showed association with diabetes, age, waist perimeter, systolic blood pressure and dyslipidemia, after adjusting the model for other variables, only age and waist perimeter had positive significance.

In subjects without cardiovascular risk factors, VV signal in the left common carotid correlated the GIM in the same area and age. This correlation was not found in the right carotid neither for average values between left and right. Once analyzed, the anthropometric and biochemical parameters (triglycerides, C-reactive protein, systolic

and diastolic blood pressure, waist perimeter and body mass index) we could not demonstrate a correlation with the VV signal neither with the right and left carotid.

Patients with type 1 DM showed an increased VV signal compared with non diabetic subjects and these differences remained significant after adjusting the model for factors of cardiovascular confusion. There were no significant differences between the VV signal and the GIM on patients with and without diabetic retinopathy.

## **CONCLUSIONS**

Patients with type 2 diabetes mellitus have a higher prevalence of subclinical atheromatous disease that subjects without diabetes mellitus.

The role of nursing professionals is essential in prevention and health promotion, through the realization of ultrasound procedures, identification of cardiovascular risk factors and the education for health.

It has been developed a standardized ultrasound method for quantifying the signal of vasa vasorum in the adventitious common carotid which is valid, reliable, and reproducible.

The signal evaluation of vasa vasorum in the adventitia carotid may be a new marker for exploration and monitoring of the atherosclerotic process.

Patients with type 1 diabetes have greater vasa vasorum signal that those without diabetes, suggesting that the wall of the large arteries can also be considered a target of diabetic microangiopathy.

It was unable to demonstrate an association between VV signal and the presence of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus.



## **ABREVIACIONS**

**ADA** – American Diabetes Association

**CV** – Cardiovascular

**DM** – Diabetis Mellitus

**DM1** – Diabetis Mellitus tipus 1

**DM2** – Diabetis Mellitus tipus 2

**GIM** – Gruix íntima-mitja

**MCV** – Malaltia Cardiovascular

**OMS** – Organització Mundial de la Salut

**SNS** – Sistema Nacional de Salut

**UDETMA** – Unitat de Prevenció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques

**VV** – Vasa Vasorum





# ÍNDEX

<b>1. PRESENTACIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>5</b>
<b>3. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b> .....	<b>13</b>
3.1. Hipòtesi.....	13
3.2. Objectius.....	13
3.3. Resum breu dels articles .....	14
<b>4. ARTICLES</b> .....	<b>15</b>
4.1. Subclinical carotid atherosclerosis in asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus .....	15
4.2. Left carotid vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors.....	25
4.3. Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients.....	33
4.4. Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus. ....	39
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	<b>47</b>
5.1. Aterosclerosi subclínica en la diabetis mellitus tipus 2.....	47
5.2. Quantificació del senyal de vasa vasorum en població no diabètica i sense altres factors de risc cardiovascular.....	50
5.3. Quantificació del senyal de vasa vasorum en pacients amb diabetis mellitus tipus 1 .....	54
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>57</b>
<b>7. FUTURES LÍNIES DE RECERCA</b> .....	<b>58</b>
<b>8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</b> .....	<b>59</b>



# 1. PRESENTACIÓ

---

Aquesta tesi doctoral s'estructura segons les directrius de la normativa per a la presentació de Tesis Doctorals en format d'articles, aprovada per Acord núm. 19/2002 de la Universitat de Lleida.

Els estudis realitzats en la present Tesi Doctoral formen part d'una mateixa línia de recerca iniciada l'any 2010 i dirigida a profunditzar en l'estudi en l'aterosclerosi de la paret arterial carotídia associada a la diabetis mellitus, així com en la identificació dels principals factors de risc cardiovascular.

Els resultats obtinguts han aportat informació rellevant en aquest camp i han estat publicats en forma de 4 articles en revistes d'impacte internacional.

**Títol:** Subclinical carotid atherosclerosis in asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus.

**Autors:** **Rubinat E**, Marsal JR, Vidal T, Cebrian C, Falguera M, Vilanova MB, Betriu A, Fernández E, Franch J, Mauricio D.

**Revista:** Journal of Cardiovascular Nursing. 2015 Mar 30. Publicació online.

**Factor d'impacte:** 1.809 (Quartil 1)

**Títol:** Left carotid vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors.

**Autors:** Arcidiacono MV, **Rubinat E**, Borràs M, Betriu A, Vidal T, Trujillano J, Mauricio D, Fernández E.

**Revista:** Cardiovasc Ultrasound. 2015; 13:20.

**Factor d'impacte:** 1.283 (Quartil 3)

**Títol:** Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients.

**Autors:** Arcidiacono MV, **Rubinat E**, Ortega E, Betriu A, Fernández E, Mauricio D.

**Revista:** Atherosclerosis. 2013; 229:459-61.

**Factor d'impacte:** 3.971 (Quartil 1)

**Títol:** Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus

**Autors:** **Rubinat E**, Ortega E, Traveset A, Alonso N, Betriu A, Granado-Casas M, Hernández M, Soldevila J, Puig-Domingo M, Jurjo C, Fernández E, Mauricio D.

**Revista:** Atherosclerosis. 2015; 241:334-338.

**Factor d'impacte:** 3.971 (Quartil 1)

Com a informació addicional, mencionar que la doctoranda ha format part de l'equip d'investigació dels següents articles, centrats també en la paret arterial i la diabetis mellitus:

- Alcubierre N, Valls J, **Rubinat E**, Cao G, Esquerda A, Traveset A, Granado-Casas M, Jurjo C, Mauricio D. Vitamin D deficiency is associated with the presence and severity of diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Res. Epub 2015 May 30; 215:374178.

Factor d'impacte: 3.536 (Quartil 2)

- Alonso N, Traveset A, **Rubinat E**, Ortega E, Alcubierre N, Sanahuja J, Hernández M, Betriu A, Jurjo C, Fernández E, Mauricio D. Type 2 diabetes-associated carotid plaque burden is increased in patients with retinopathy compared to those without retinopathy. Cardiovasc Diabetol. 2015; 14:33.

Factor d'impacte: 3.706 (Quartil 2)

- Arciadiacono MV, Traveset A, **Rubinat E**, Ortega E, Betriu A, Hernández M, Fernández, Mauricio D. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013; 228:142-7.  
Factor d'impacte: 3.971 (Quartil 1)
- Alcubierre N, **Rubinat E**, Traveset A, Martinez-Alonso M, Hernandez M, Jurjo C, Mauricio D. A prospective crosssectional study on quality of life and treatment satisfaction in type 2 diabetic patients with retinopathy without other major late diabetic complications. *Health Qual Life Outcomes*. 2014; 12:131.  
Factor d'impacte: 2.10 (Quartil 2)

La doctoranda va ser part activa, entre 01/2010 – 12/2014, de la recerca realitzada al Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova com a coordinadora de projectes propis del servei i d'assajos clínics en pacients amb diabetis mellitus tipus 2, tipus 1, tipus LADA, aterosclerosi i en prevenció cardiovascular. A més, col·labora en línies d'investigació paral·leles del Servei de Nefrologia i dins del marc de la UDETMA (Unitat de Prevenció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques). Per últim, mencionar que és experta en tècniques ecogràfiques carotídies i femorals, duent a terme aquestes exploracions a tots els participants de l'estudi.

Aquest treball ha estat finançat en part per el Instituto de Salud Carlos III, en els projectes FIS PS09/01035, PI12/00183 i PS09/01999. La matrícula de tesi durant el primer any 2011 va ser finançada amb la beca de la Universitat de Lleida "Convocatòria d'ajuts a la matrícula en programes de doctorat de la UDL per al curs 2010-2011".



## 2. INTRODUCCIÓ

---

Segons l'ADA (American Diabetes Association), la diabetis mellitus (DM) és una malaltia crònica i d'etiologia multifactorial que apareix quan el pàncrees no produeix insulina suficient i/o quan l'organisme no utilitza eficaçment la insulina que produeix. La definició de diabetis engloba varies malalties metabòliques amb un mateix nexa en comú, la hiperglucèmia. Aquesta situació mantinguda d'hiperglucèmia pot produir complicacions microvasculars i/o macrovasculars, comuns en tots els tipus de diabetis [1].

Els diferents tipus de DM es classifiquen segons la seva etiologia, però en aquest treball ens centrarem en la diabetis mellitus tipus 1 (DM1) i tipus 2 (DM2), que destaquen per ser les més prevalents en la població, especialment la darrera [2].

La DM1 representa entre el 5 i el 10% de tots els casos de DM a nivell mundial. La incidència és molt variable en funció de l'àrea geogràfica, des de 0.7/100.000 persones a Xina fins a 52.6/100.000 persones a Finlàndia entre les poblacions en edat de risc, i aquest fet es podria explicar tant per factors genètics com ambientals [3].

En l'estudi EURODIAB, dut a terme en 17 països europeus, es van estudiar els nous casos de DM1 diagnosticats en la població de menys de 15 anys entre 1989 i 2003, detectant un increment en la taxa d'incidència anual en aquest període d'un 3.9%, especialment en el rang d'edat més jove (0-4 anys), i pronosticant que la prevalença en els menors de 15 anys augmentarà de 94.000 casos l'any 2005 a 160.000 en el 2020 [4].

La DM tipus 2 és una de les malalties cròniques amb major prevalença, afectant en l'actualitat a més de 347 milions de persones arreu del món [5].

Un estudi publicat l'any 2009 per Shaw et al. va estimar la prevalença mundial de diabetis entre 2010 i 2030, pronosticant un increment del 7.7% (439 milions d'adults) l'any 2030. L'estimació d'increment de casos en pràcticament totes les regions del món es situa en el 54% [6].

En l'àmbit estatal, l'estudi [Di@bet.es](http://Di@bet.es) és el primer estudi que avalua la prevalença de diabetis mellitus a Espanya. Entre les dades que se'n desprenen figura una prevalença



global de diabetis mellitus del 13.8% dels quals un 6.0% desconeixia l'existència de la malaltia. La prevalença de glucèmia basal alterada va ser del 3.4% i d'intolerància a la glucosa del 9.2%. La prevalença augmenta progressivament amb l'edat, i és més freqüent en homes que en dones [7].

Aquesta elevada prevalença de diabetis (DM1 i DM2) present en la nostra població, juntament amb les importants comorbiditats associades, repercuteix directament en les despeses del Sistema Nacional de Salut (SNS), i encara més en la qualitat de vida i en els anys de vida perduts. Es va calcular que l'any 2012 el cost global de la DM va ascendir a 5.809 milions d'euros, quantitat equivalent al 8,2% de la despesa sanitària total per al SNS. El cost anual per pacient diabètic es va estimar en 1.770 euros. És important destacar que les complicacions associades a la DM suposen el 37% del cost total anual de la diabetes, representant el principal factor d'impacte econòmic. No obstant, són també els costos més susceptibles de ser reduïts mitjançant un millor control de la malaltia i un tractament més optimitzat [8].

És precisament com a conseqüència d'aquestes complicacions associades que l'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que la DM esdevindrà la setena causa de mortalitat l'any 2030 [9].

Les complicacions de la DM es classifiquen segons la mida del vas arterial afectat en macroangiopàtiques (malaltia coronària, malaltia cerebrovascular, malaltia vascular perifèrica), i microangiopàtiques (retinopatia, nefropatia, neuropatia), induint la lesió de l'òrgan diana en aquestes últimes a la ceguesa, la insuficiència renal i les amputacions d'extremitats inferiors, respectivament.

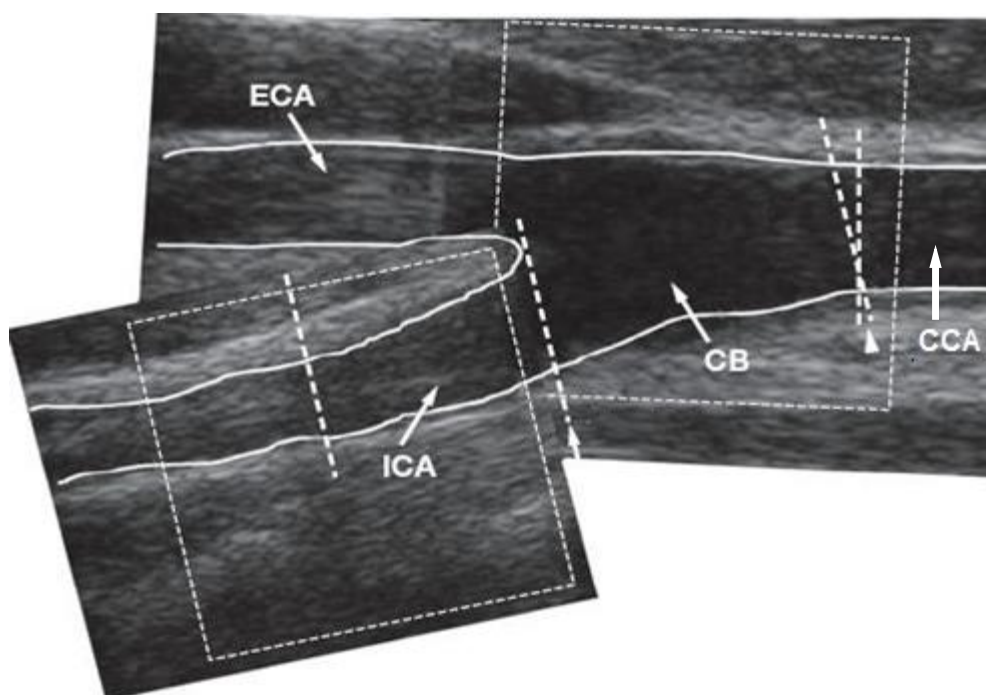
La DM constitueix un factor de risc important per al desenvolupament de l'aterosclerosi, principal causa en l'aparició de malalties cardiovasculars (MCV) [10]. L'aterosclerosi és un procés inflamatori crònic que es caracteritza per l'alteració funcional i estructural de la paret arterial.

Actualment, les MCV associades a l'aterosclerosi han esdevingut la primera causa de mort a nivell mundial [11]. Els principals factors de risc cardiovascular s'han classificat tradicionalment en no modificables (edat, sexe, raça, factors genètics), i modificables per canvis en l'estil de vida com la diabetis, el tabac, la hipertensió, l'obesitat i la dislipèmia. En els pacients amb diabetis mellitus, tant tipus 1 com tipus 2,

el risc de malaltia ateromatosa es troba clarament incrementat i, per tant, la diabetis mellitus és un factor de risc molt important en l'aparició d'esdeveniments CV en aquests pacients [12,13]. La detecció precoç d'aterosclerosi subclínica en subjectes amb factors de risc cardiovascular juga un paper principal en la prevenció de la MCV [14].

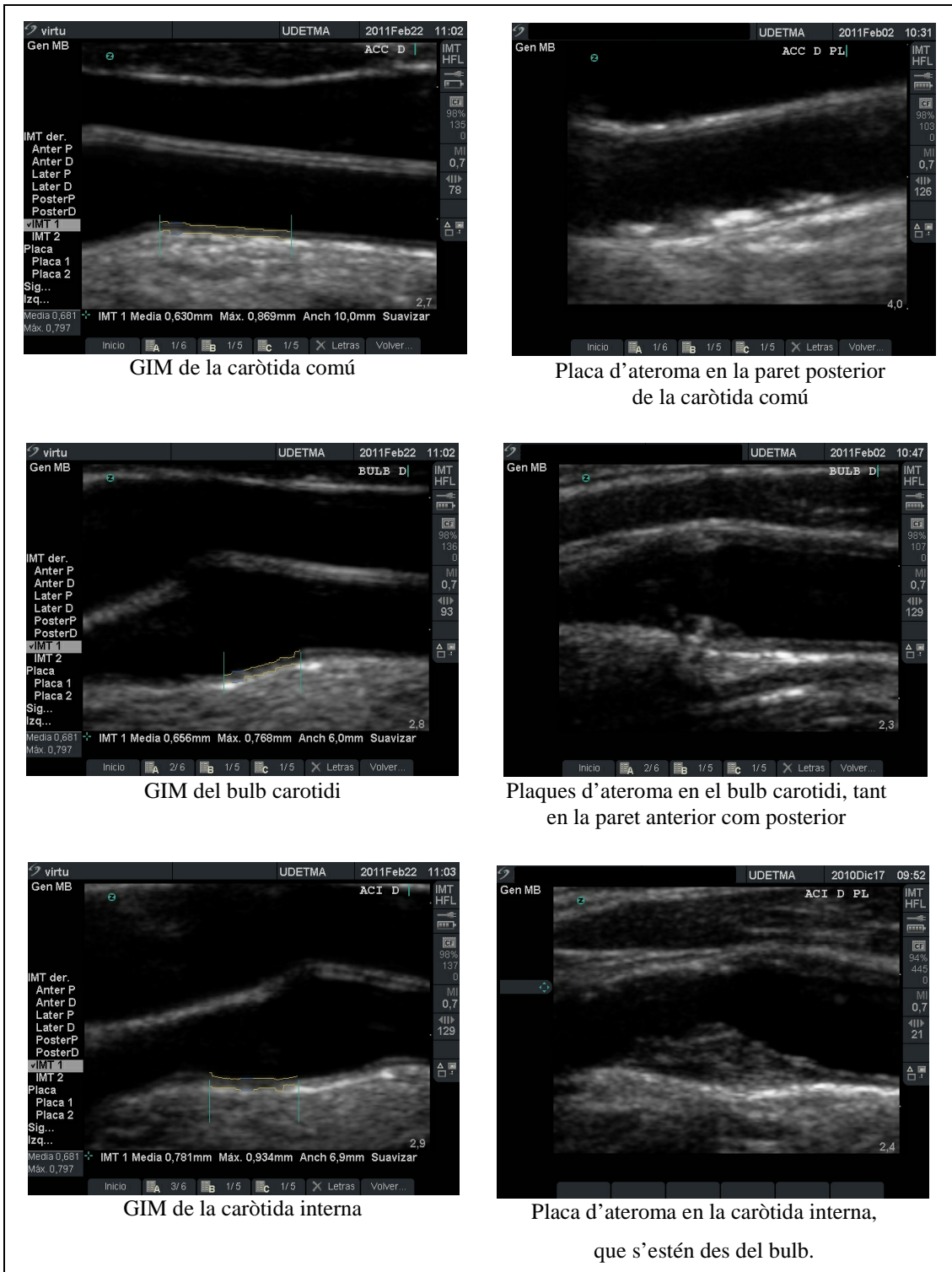
La detecció d'aterosclerosi mitjançant ecografia carotídia, que inclou la mesura del gruix íntima-mitja (GIM) i la detecció de placa d'ateroma, és un mètode suficientment descrit i validat en l'actualitat [15, 16, 17], a més de tractar-se d'un mètode ràpid, no invasiu, barat i innoeu per al pacient.

Per a l'avaluació de la presència d'aterosclerosi a les artèries caròtides es segueixen els criteris de Mannheim [18]. Cadascuna de les dues caròtides s'estudiarà individualment, dividint-la en 3 segments: comú, bulb i interna (Figura 1). En cadascun d'aquests segments es mesurarà quantitativament el GIM i s'observarà la presència o absència de placa d'ateroma, definida com un GIM superior a 1.5mm i que posteriorment es classificarà, en el cas del nostre grup, utilitzant la classificació validada per de Bray JM et al. [19].



**Figura 1** - CCA: Artèria Comú Carotídia, CB: Bulb Carotidi, ICA: Artèria Caròtida Interna, ECA: Artèria Caròtida Externa.

En les imatges que es presenten en la Figura 2 s'observen les mesures de GIM en cadascun dels segments carotidis sotmesos a estudi (comú, bulb i interna), en aquest cas en concret en la caròtida dreta, i paral·lelament aquests mateixos territoris ocupats per una placa d'ateroma.

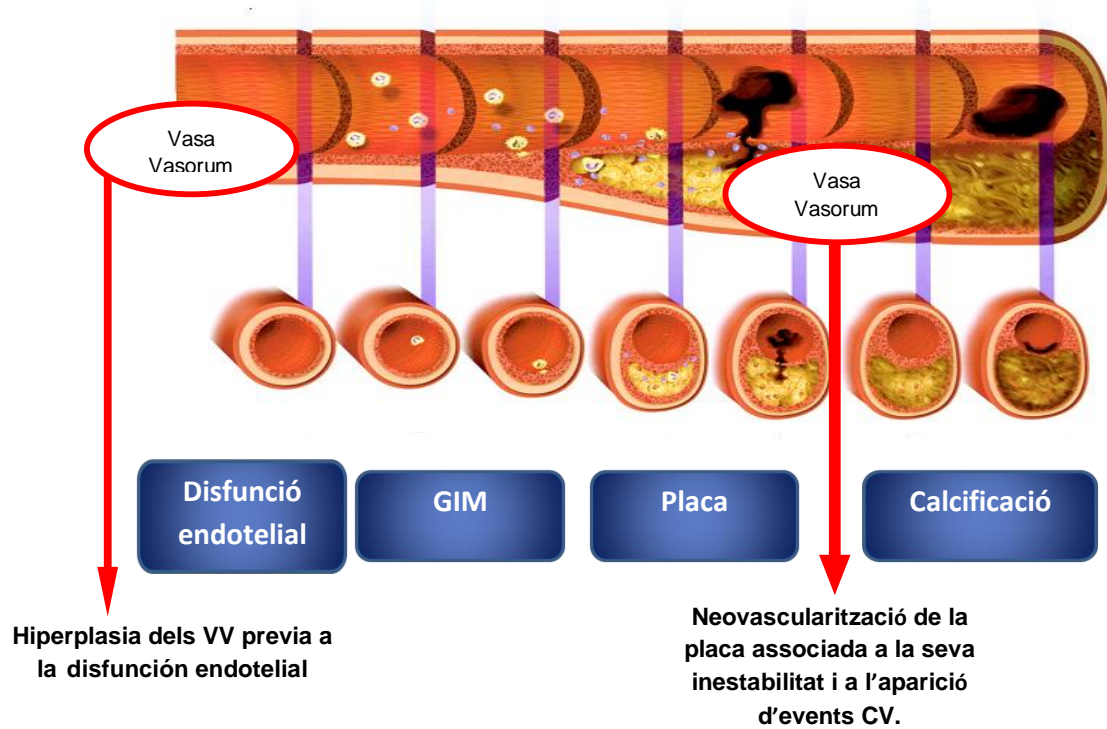


**Figura 2** – Mesures de GIM i presència de placa en els tres segments carotidis estudiats: comú, bulb i interna.

El GIM s'associa a la majoria de factors de risc cardiovascular (edat, sexe, tabaquisme, hipertensió, dislipèmia) [20, 21], i a més és un predictor independent en l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars tant en la DM2 [22] com en la DM1 [12].

Actualment, se sap que el procés arterioscleròtic s'inicia molt abans de l'aparició de l'event cardiovascular, inclús abans de la detecció d'un augment anormal en el GIM. Els vasa vasorum (VV) són un plexe de microvasos que en condicions normals es troben a la capa adventícia de les grans i mitjanes artèries amb la missió de subministrar oxígen i nutrients al terç més extern de la paret arterial. La hiperplàsia dels VV acompanya la fase inicial d'inflamació, i a mida que progressa el procés ateromatós apareixen nous microvasos que s'estenen de l'adventícia cap a la capa íntima i mitja, produint una neovascularització anormal en aquestes zones [23], així com en la pròpia placa d'ateroma, augmentant-ne la inestabilitat de la mateixa i facilitant-ne la seva ruptura (Figura 3).

En la Figura 3, s'observa el procés ateroscleròtic, des de la fase més inicial d'hiperplàsia dels VV adventicis, passant per la detecció d'un GIM augmentat i la posterior formació de la placa d'ateroma que pot acabar calcificant-se, si abans no es desprèn com a conseqüència de la inestabilitat produïda per la neovascularització intraplaca i que pot conduir a l'aparició dels esdeveniments cardiovasculars.



**Figura 3** – Representació del procés ateroscleròtic des de la disfunció endotelial fins a la calcificació de la placa d'ateroma.

L'aterosclerosi s'ha observat principalment en les grans artèries (aorta, coronària, caròtida i femoral), donant lloc a les anomenades complicacions macroangiopàtiques de la diabetis. No obstant això, recentment un nou corrent de pensament suggereix l'existència d'un mecanisme comú per al desenvolupament de les complicacions microangiopàtiques i macroangiopàtiques [24], entenent que comparteixen, al menys en part, els mateixos mecanismes patològics [25, 26].

Barger et al. va evidenciar el rol de la neoangiogènesi dels vasa vasorum en la patogènia de l'aterosclerosi coronària i en l'aparició d'esdeveniments coronaris isquèmics [27]. Posteriorment, es va trobar evidència que la neovascularització de la capa íntima arterial originada en l'adventícia jugava un paper important en l'aparició d'aquests esdeveniments [28, 29]. La hipòxia i la isquèmia són els principals estímuls per a l'angiogènesi dels VV [23], comú també en els canvis vasculars que es produeixen en la retinopatia diabètica [30].

Tot i que diversos autors reconeixen una possible implicació de la patologia microvascular en la progressió de l'aterosclerosi en la diabetis mellitus, fins ara els estudis que s'han dut a terme han estat focalitzats en la contribució de la neovascularització dels VV només específicament en el procés de formació i ruptura de la placa d'ateroma [25, 26, 31, 32].

A la dècada dels anys 60, Angerval et al. en un estudi postmortem avaluaren les artèries aortes de subjectes joves amb diabetis tractada amb insulina i van trobar que els VV mostraven característiques anàlogues a la microangiopatia que es produïa en altres territoris, postulant doncs que les lesions en els VV possiblement esdevenen un factor important en el desenvolupament de l'aterosclerosi aòrtica [33]. Malauradament, aquest estudi ha estat ignorat des de llavors per la comunitat científica que investiga en aquesta àrea.

El nostre grup de recerca va proposar la hipòtesis de que els microvasos de les grans artèries són una diana de la microangiopatia diabètica similar a la d'altres localitzacions ben reconegudes com en els casos dels microvasos de la retina, del glomèrul renal, i del nervi perifèric [34]. Coneixem bé que la situació d'hiperglucèmia crònica, característica de la diabetis, afecta la microcirculació dels òrgans diana clàssics i, per tant, vàrem hipotetitzar que la hiperglucèmia origina també canvis microangiopàtics en els VV de les grans artèries abans de que aparegui la placa d'ateroma, sent aquest un dels factors que explicaria les característiques diferencials en l'aterosclerosi diabètica. D'aquesta manera, la microangiopatia de la paret de les grans artèries pot esdevenir el substrat per a una progressió més ràpida i greu de l'aterosclerosi, concebant així que els subjectes amb complicacions microangiopàtiques també presentarien una microangiopatia dels VV, amb signes d'angiogènesi incrementada en la paret de les seves grans artèries.

Aquesta hipòtesi va ser investigada pel nostre grup de recerca en un estudi previ amb pacients amb diabetis mellitus tipus 2, en el que es va demostrar que els subjectes amb aquest tipus de diabetis presentaven, a l'exploració del senyal de VV, una major angiogènesi dels VV en l'artèria caròtida comú que els subjectes no diabètics, i a més, el senyal de VV en els subjectes diabètics amb retinopatia era més intensa que en aquells sense retinopatia. Això suposava una evidència indirecta de l'associació de la retinopatia amb una microangiopatia de la microcirculació de la paret arterial de la caròtida [34].

Per a dur a terme l'avaluació quantitativa dels VV ens vàrem basar en la descripció del concepte comunicada prèviament com a resum d'un congrés per Adam D et al. [35], i a partir del qual el nostre grup ha desenvolupat una tècnica de lectura del senyal de VV mitjançant l'ecografia amb contrast de microbombolles. Tant el procediment ecogràfic per a l'adquisició de les imatges com el mètode emprat per a la quantificació del senyal de VV es descriu en un dels articles que conformen aquesta tesi [36]. Es tracta d'un mètode totalment innovador, ja que no hi ha a la literatura prèvia cap article original que descriu la quantificació de VV en un segment de l'artèria caròtida (comú) lliure de placa d'ateroma. El grup de Feinstein va ser el primer en utilitzar l'ecografia amb contrast amb l'objectiu d'estudiar el paper de la malaltia microvascular de la gran artèria en el desenvolupament de la MCV [37]. Els seus estudis van demostrar que els VV de l'adventícia i la neovascularització de la placa estaven íntimament associats a la gravetat de la placa i als esdeveniments CV [38, 39]. Altres treballs que també van utilitzar l'ecografia amb contrast van concloure que la presència de neovasos en la placa detectats per ecografia es correlacionava amb troballes histològiques [40, 41]. No obstant això, tot i que en la mostra emprada per a dur a terme aquests estudis s'incloïen pacients amb DM, no es tractava d'uns resultats específics per aquesta població i tampoc es relacionava amb la presència de microangiopatia en altres territoris.

Tenint en compte tot el descrit anteriorment, en aquesta tesi ens vàrem plantejar avaluar la presència d'ateromatosi subclínica en pacients amb DM2, avaluar la validesa de la tècnica de quantificació del senyal de VV en població lliure de factors de risc cardiovasculars, i determinar si aquest senyal es trobava incrementat en pacients amb DM1 en comparació amb pacients no diabètics, a més de ser més elevat en aquells pacients diabètics amb retinopatia associada.

## **3. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

---

### **3.1 Hipòtesi**

1. Els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 sense malaltia cardiovascular clínica prèvia presenten amb més freqüència signes de malaltia ateromatosa subclínica precoç en relació als pacients sense diabetis: major gruix íntima-mitja i més freqüència de placa ateromatosa en el territori carotídi.
2. El senyal de vasa vasorum en la paret de l'artèria caròtida comun es pot mesurar mitjançant l'ecografia amb contrast de microbombolles. Aquest senyal es pot determinar de manera estandarditzada a través d'un quocient entre el senyal de contrast de la paret i el de la llum del vas.
3. En el procés d'aterosclerosi en la diabetis, la microangiopatia pot afectar a la paret de les grans artèries com a factor que contribueix a l'aterosclerosi en aquests pacients. En la diabetis mellitus tipus 1, el senyal de vasa vasorum està incrementat i s'associa a la presència de retinopatia diabètica.

### **3.2 Objectius**

1. Avaluar la presència de malaltia ateromatosa subclínica en els pacients amb diabetis tipus 2 i la seva relació amb els principals factors de risc cardiovascular, en comparació amb subjectes sense diabetes.
2. Establir i estandarditzar una metodologia de lectura del senyal de vasa vasorum de la paret de l'artèria caròtida comú mitjançant ecografia amb contrast de microbombolles en un segment lliure de placa d'ateroma. Establir els valors de referència en subjectes sense factors de risc cardiovascular.
3. Avaluar la microcirculació de la paret de les artèries caròtides (variable principal: senyal de vasa vasorum en l'ecografia amb contrast) en els pacients amb diabetis tipus 1, amb i sense retinopatia, com a complicació microvascular de referència i comparar-ho amb persones sense diabetis.



### 3.3 Resum breu dels articles

El primer article, titulat “*Subclinical carotid atherosclerosis in asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus*”, va tenir com a objectiu avaluar la presència d’indicadors d’ateromatosi carotídia en els pacients amb diabetis tipus 2 en comparació amb subjectes no diabètics, i la seva associació amb els diferents factors de risc cardiovascular. Aquest article ha estat publicat a *Journal of Cardiovascular Nursing*.

El segon article, titulat “*Left carotid vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors.*”, descriu una nova metodologia de manera estandarditzada de quantificació del senyal de vasa vasorum en l’adventícia de la caròtida comú en subjectes sense cap factor de risc cardiovascular, establint els valors fisiològics i de referència en aquesta població. Aquest article ha estat publicat a *Cardiovascular Ultrasound*.

El tercer article es titula “*Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients*”. L’objectiu en aquest article va ser clarificar la validesa de la tècnica utilitzada per a la lectura del senyal dels vasa vasorum, i discutir-ne els diferents aspectes metodològics. Aquest article ha estat publicat a *Atherosclerosis*, com a *Invited Commentary*, després de demanar l’editor que s’avaluessin i es comentessin els aspectes metodològics de la tècnica emprada en els nostres estudis.

El quart article es titula “*Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus*”. Els objectius d’aquest estudi van ser avaluar les diferències entre el senyal de vasa vasorum dels subjectes amb DM1 respecte un grup control lliure de factors de risc cardiovascular, i avaluar si aquest senyal es trobava incrementat en els pacients diabètics amb retinopatia respecte als que no presentaven aquesta complicació microangiopàtica. Aquest article ha estat publicat a *Atherosclerosis*.

## 4. ARTICLES

---

### 4.1 Subclinical carotid atherosclerosis in asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus.

Autors: **Rubinat E**, Marsal JR, Vidal T, Cebrian C, Falguera M, Vilanova MB, Betriu À, Fernández E, Franch J, Mauricio D.

Publicat online a Journal of Cardiovascular Nursing. 2015 Mar 30.

La MCV associada a l'aterosclerosi és la principal causa de mort en els pacients amb DM2. L'avaluació de la malaltia arterioscleròtica subclínica, mitjançant la quantificació del GIM i la presència de placa d'ateroma, per ecografia carotídia és un mètode validat i acceptat de manera universal, recomanant-se el seu ús en determinats grups de risc.

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la presència d'aterosclerosi carotídia subclínica en un grup de pacients amb DM2 sense MCV prèvia, i la seva comparació amb pacients sense diabetes en la nostra població.

Es dissenyà un estudi de casos i controls, observacional i transversal en el que es van incloure un total de 374 pacients, 187 pacients amb DM2 aparellats per sexe i edat amb 187 pacients sense DM2, tots ells sense MCV.

Es van recollir dades demogràfiques, antropomètriques i pròpies de l'ecografia carotídia. Les variables i el seu mètode d'avaluació es descriuen en l'article.

Els resultats més rellevants van ser que tant el GIM com la freqüència de plaques es trobaven significativament incrementats en els DM2 respecte al grup control, trobant-se més incrementats en homes que en dones, i mostrant un augment progressiu amb l'edat. En el model multivariant, el GIM s'associava amb la diabetis, l'edat, el sexe i la tensió

arterial sistòlica; i la placa d'ateroma, que tot i que inicialment s'associava a la diabetis, l'edat, el perímetre de cintura, la tensió arterial sistòlica i la hipercolesterolèmia, després d'ajustar el model aquesta associació només es va mantenir positiva per a l'edat i el perímetre de cintura.

Es conclou que els pacients amb DM2 presenten major prevalença de malaltia ateromatosa subclínica associada a factors de risc cardiovascular, i que l'ecografia carotídia és un instrument de cribatge validat de gran utilitat per a la detecció precoç de malaltia ateroscleròtica subclínica. A més, aquest estudi ha estat conduït per professionals infermers i mostra la importància del rol d'aquests professionals en la detecció precoç i la prevenció de la MCV.

# Subclinical Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus

Esther Rubinat, RN, MSc; Josep Ramon Marsal, Stat; Teresa Vidal, RN; Cristina Cebrian, RN; Mireia Falguera, MD; Ma. Belen Vilanova, MD; Àngels Betriu, MD, PhD; Elvira Fernández, MD, PhD; Josep Franch, MD, PhD; Dídac Mauricio, MD, PhD

**Background:** Subjects with type 2 diabetes mellitus are considered to be at high risk for cardiovascular disease. The identification of carotid atherosclerosis is a validated surrogate marker of cardiovascular disease. Nurses are key professionals in the improvement and intensification of cardiovascular preventive strategies. **Aims:** The aim is to study the presence of carotid atherosclerosis in a group of asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus and no previous clinical cardiovascular disease. **Methods:** A total of 187 patients with type 2 diabetes mellitus and 187 age- and sex-matched subjects without type 2 diabetes mellitus were studied in this cross-sectional, observational, cohort study. Standard operational procedures were applied by the nursing team regarding physical examination and carotid ultrasound assessment. Common, bulb, and internal carotid arteries were explored by measuring intima-media thickness and identifying atherosclerotic plaques. **Results:** Carotid intima-media thickness (c-IMT) and carotid plaque prevalence were significantly greater in diabetic subjects than in the control group. Carotid plaques and c-IMT were more frequent in men than in women and increased with increasing age. In the multivariate analysis, age, gender, waist circumference, systolic blood pressure, and hypercholesterolemia were positively associated with c-IMT, whereas age, gender, and weight were positively associated with carotid plaque. **Conclusion:** The current nurse-led study shows that subjects with type 2 diabetes mellitus have a high prevalence of subclinical atherosclerosis that is associated with cardiovascular risk factors.

**KEY WORDS:** atherosclerotic plaque, cardiovascular diseases, carotid intima-media thickness primary prevention, type 2 diabetes mellitus

## Esther Rubinat, RN, MSc

Research Nurse, PhD Student, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Arnau de Vilanova; and Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, University of Lleida, Spain.

## Josep Ramon Marsal, Stat

Statistician, Unitat de Suport a la Recerca de Lleida, Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol (IDIA Jordi Gol), Lleida; and Unitat de Epidemiologia, Servicio de Cardiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

## Teresa Vidal, RN

Nurse, Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova; and Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

## Cristina Cebrian, RN

Nurse, Primary Health Care Center Primer de Maig, Lleida, Spain.

## Mireia Falguera MD

General Practitioner, Primary Health Care Center Igualada Nord, Spain.

## Ma. Belen Vilanova, MD

General Practitioner, Primary Health Care Center Igualada Nord, Spain.

## Àngels Betriu, MD, PhD

Coordinator, Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova; and Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

## Elvira Fernández, MD, PhD

Head of Department and Associate Professor, Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari

Arnau de Vilanova; and Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

## Josep Franch, MD, PhD

General Practitioner, Primary Health Care Center Raval Sud; and Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol, Barcelona, Spain.

## Dídac Mauricio, MD, PhD

Chief Physician, Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida; Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol, Barcelona; and Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Germans Trias Pujol, Badalona, Spain.

This study was funded in part by grants nos. PS09/01035 and PI12/00183 from Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain. Both included in Plan Nacional de I+D+i and co-financed by Instituto de Salud Carlos III - Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

## Correspondence

Esther Rubinat, MSc, RN, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (erubinat.irblleida@gmail.com) or Dídac Mauricio, MD, PhD, Department of Endocrinology & Nutrition, Hospital Germans Trias Pujol, Carretera Can Ruti S/N, 08916, Badalona, Spain (didacmauricio@gmail.com).

DOI: 10.1097/JCN.0000000000000236

Cardiovascular disease is the main cause of death in type 2 diabetic subjects.<sup>1,2</sup> It has been shown that individuals with diabetes mellitus are at 2- to 4-fold increased risk for cardiovascular disease. Furthermore, 65% of deaths in these individuals are related to coronary heart disease or stroke,<sup>3,4</sup> the common basis for which is atherosclerosis, a chronic degenerative process characterized by a pathological asymmetric enlargement of the internal layer of the artery.<sup>5</sup>

The identification of subjects at high cardiovascular risk may play a major role in primary cardiovascular disease prevention.<sup>6</sup> The detection of subclinical atherosclerosis is a surrogate marker to predict cardiovascular events, and its assessment through carotid ultrasound, including the measurement of carotid intima-media thickness (c-IMT) and the identification of plaques, is a validated method.<sup>7-9</sup> Previous studies have shown that c-IMT is significantly greater in diabetic subjects in comparison with nondiabetic subjects.<sup>10</sup> In addition, c-IMT is an independent predictor of cardiovascular events in type 2 diabetic patients with no previous symptomatology.<sup>11</sup> Moreover, increased c-IMT, coupled with the presence of atherosclerotic plaques, is associated with acute ischemic stroke and microvascular disease in subjects with type 2 diabetes mellitus.<sup>12-14</sup>

It is known that atherosclerosis begins in the prediabetic stage and has an asymptomatic progression before the cardiovascular event occurrence,<sup>15</sup> hence the importance of early detection. The American Heart Association recommends carotid ultrasound assessing the presence of atherosclerosis to identify those subjects at high cardiovascular risk, such as diabetic patients.<sup>16</sup> Therefore, it is important to establish screening programs using carotid ultrasound for the early detection of subclinical cardiovascular disease.

The role of the nurse may be pivotal in strategies aimed at the identification of subjects at cardiovascular risk and the promotion of health education focused on prevention and health promotion. A well-trained nursing team with ample experience in this area can lead the early detection of atherosclerotic disease and related health-promoting activities. The importance of nurses in these areas has been established in the context of the multidisciplinary Unit for Detection and Treatment of Atherothrombotic Disease (UDETMA) of the Hospital Universitari Arnau de Vilanova in Lleida, Spain ([www.udetma.com](http://www.udetma.com)). The UDETMA is a pioneering Spanish organization with extensive experience in research, early detection and treatment of atherosclerotic disease and is focused on cardiovascular disease prevention.<sup>17-19</sup> The UDETMA is integrated as a multidisciplinary team, in which the nursing role is especially relevant because it is the nurse who conducts all carotid ultrasound procedures, assesses cardiovascular risk factors, and when necessary, offers individualized lifestyle advice and potential follow-up.

Thus, within the framework of UDETMA research activities, we aimed to investigate the presence of subclinical carotid atherosclerosis and the association with other cardiovascular risk factors in a population of type 2 diabetes mellitus subjects with no previous cardiovascular disease and to compare this population with a control group without diabetes. Furthermore, the results obtained may help to better characterize the population at risk and thus to design more specific future prevention strategies.

## Methods

### Design and Procedures

This was a cross-sectional, observational, cohort study. From an original population of 700 subjects identified during a 1-year period, we could identify a group of 187 subjects with type 2 diabetes and a comparison group of 187 sex- and age-matched subjects without diabetes.

Diabetic subjects were included from their first clinical visit with the nursing staff at UDETMA during a 1-year period. It is important to highlight that the activity of the unit focused on cardiovascular prevention, so none of the patients who attended this clinical unit had established cardiovascular disease. All subjects are referred to this unit by their primary care team if 2 or more cardiovascular risk factors are detected. Comparison subjects were randomly selected from the general population as part of another ongoing population-based study conducted at the primary care level by our team during the same 1-year study period. Medical records of these patients were reviewed to ensure that they did not have history of cardiovascular disease, diabetes, hypercholesterolemia, nor hypertension before screening. The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.<sup>20</sup> These studies were all approved by the local Ethics Committee, and all participants gave signed informed consent before inclusion in the study.

The inclusion criteria for this study were to be 18 years or older and having received the diagnosis of type 2 diabetes. Established cardiovascular disease defined by World Health Organization as coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease, congenital and rheumatic heart disease, deep vein thrombosis, and pulmonary embolism were the only exclusion criteria in both study groups. Ours is the only reference hospital for cardiovascular disease and its related procedures in the region. We also had access to reports from 3 secondary hospitals in the region to exclude any previous cardiovascular events. Therefore, apart from anamnestic evaluation, we could ascertain any cardiovascular event that occurred in the healthcare area.

The following data were collected from each subject:

- Demographic data: age; gender; smoking status; previous diagnoses of hyperlipidemia and hypertension, defined as current treatment with lipid-lowering and blood pressure drugs, respectively; and type 2 diabetes

mellitus diagnoses according to 1999 World Health Organization criteria.<sup>21</sup>

- Anthropometric measures and physical examination: blood pressure was recorded according to the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure guidelines,<sup>22</sup> using a blood pressure monitor (HEM-7001E; Omron, Spain) to record the systolic blood pressure and diastolic blood pressure. Body weight (kilograms), height (meters), and waist circumference (centimeters) were measured by standard procedures, and the body mass index was also calculated.
- Carotid ultrasound was performed using a Vividi (General Electric Healthcare, Wisconsin) equipped with a linear transducer (8L) with a frequency range from 8 to 13 MHz. Both carotids were examined following the standardized operational procedure and the Mannheim consensus.<sup>23</sup> The standard procedure conducted in this study consisted of first, a cross-sectional view of the common, bulb, and internal carotid arteries to identify atherosclerotic plaques, defined as a focal encroachment into the lumen of the carotid. Second, an online measurement of the carotid intima-media thickness (c-IMT) in these 3 areas was performed using the Auto-IMT software (GE Healthcare, Haifa, Israel), and the average of these measures was calculated. Values of c-IMT above 1.5 mm were considered as plaques.<sup>24</sup> For this study, the assessment of all of the measures and the performance of ultrasound studies were conducted by 2 research nurses (ER, TV).

### Ethical Approval

The study was approved by the ethics committee of the Arnau de Vilanova University Hospital (reference no. 766).

### Sample Size Calculation

The inclusion of a high number of subjects in each group enabled us to address the assessment of relevant differences between diabetic and nondiabetic study groups in

terms of c-IMT. Data from a previous study of our group were used to ensure that we could be able to detect a difference of at least 0.13 mm (SD, 0.13) between both study groups, accepting an  $\alpha$  risk of .05 and a  $\beta$  risk of .2 in a bilateral contrast.<sup>17</sup>

### Statistical Analyses

Data were expressed as mean (SD) and n (%), when appropriate. Conventional tests to assess the normality of quantitative variables were applied. Group differences were evaluated by the nonparametric Mann-Whitney test for quantitative variables and the  $\chi^2$  test for categorical variables. A logistic regression model was applied to study variables related to the presence of carotid plaque. The discrimination and calibration were assessed using the C statistic and Hosmer-Lemeshow test, respectively. In contrast, linear regression was used for the c-IMT study, and the  $R^2$  was reported. All variables with a  $P < .2$  on the descriptive analysis were included in the final model after individually removing the nonsignificant variables. The significance level was defined as  $P \leq .05$ . Data analyses were performed with the SPSS v 18.0 statistical package (IBM Corporation, Armonk, New York).

### Results

The main characteristics of the study groups are shown in Table 1. As expected, the diabetic subjects had higher prevalences of hypertension and hypercholesterolemia and higher values of body mass index, waist circumference, and systolic and diastolic blood pressure.

As expected, c-IMT increased progressively with age and was higher in men than in women (Table 2). Thus, the c-IMT mean (SD) value in the diabetic group was 0.79 (0.15), whereas for the control group was 0.72 (0.11). These differences were statistically significant ( $P < .001$ ). However, when both groups were stratified by age and sex, the differences remained significant except for men between 51 and 60 years (Table 2).

**TABLE 1** General Characteristics of the Study Groups

	Control Group (n = 187)		Type 2 Diabetes (n = 187)		Overall (N = 374)		P
Age mean (SD), y	187	55.1 (12.4)	187	57 (8.8)	374	56.1 (10.8)	.269
Gender, females, n (%)	187	112 (59.9)	187	112 (59.9)	374	224 (59.9)	1.000
Weight, mean (SD), kg	187	72.1 (12)	187	85.5 (16.3)	374	78.8 (15.7)	<.001
Body mass index, mean (SD), kg/m <sup>2</sup>	187	26.5 (3.7)	187	31.3 (5.7)	374	28.9 (5.4)	<.001
Waist circumference, mean (SD), cm	187	95.2 (10.3)	187	106.0 (13.3)	374	100.6 (13)	<.001
Systolic blood pressure, mean (SD), mm Hg	187	125.3 (15.4)	187	140 (20.1)	374	132.7 (19.3)	<.001
Diastolic blood pressure, mean (SD), mm Hg	187	79 (9.3)	187	82.3 (11.8)	374	80.6 (10.8)	0.004
Current smokers, n (%)	187	46 (24.6)	187	37 (19.8)	374	83 (22.2)	0.263
Hypertension, n (%)	187	32 (17.1)	187	112 (59.9)	374	144 (38.5)	<0.001
Hypercholesterolemia, n (%)	187	35 (18.7)	187	78 (41.71)	374	113 (30.2)	<0.001
Carotid intima-media thickness, mean (SD)	187	0.72 (0.11)	187	0.79 (0.15)	374	0.76 (0.13)	<0.001
Carotid plaque, n (%)	187	67 (35.8)	187	89 (47.6)	374	156 (41.7)	0.021

**TABLE 2** Carotid Intima-Media Thickness Distributed by Gender and Age in the 2 Study Groups

Carotid Intima-Media Thickness	Control Group (n = 187)		Type 2 Diabetes (n = 187)		P
	N	Mean (SD)	N	Mean (SD)	
Men					
<50 y	31	0.66 (0.09)	31	0.74 (0.16)	.032
51–60 y	26	0.77 (0.11)	26	0.77 (0.12)	.840
>60 y	18	0.81 (0.12)	18	0.91 (0.15)	.044
Women					
<50 y	18	0.62 (0.08)	18	0.72 (0.14)	.014
51–60 y	45	0.71 (0.09)	45	0.77 (0.15)	.033
>60 y	49	0.76 (0.09)	49	0.83 (0.14)	.006

The findings on atherosclerotic plaques followed the same pattern as c-IMT (Table 3). Thus, the presence of plaques increased with age and was higher in men than in women. Overall, the prevalence of carotid plaques in the diabetic group was 47.6, whereas that in the control group was 35.8 ( $P < .021$ ). However, for plaque, stratification by age resulted in a significant difference that was only maintained in the younger group (<50 years).

Regardless of the diabetes status, the multivariate model showed that the frequency of plaques was significantly associated with age, waist circumference, systolic blood pressure, hypercholesterolemia, and diabetes (Table 4). However, only age and waist circumference kept significance after the adjustment. The data in Table 4 show that for each year increase in age or for each 1 cm increase in waist circumference, the risk odds ratio (OR) increased significantly at 1.02 and 1.01, respectively.

We performed a multivariate logistic regression analysis, taking the presence of carotid plaques as the dependent variable. The results are displayed in Table 4. Age, waist circumference, systolic blood pressure and hypercholesterolemia, and type 2 diabetes mellitus were the variables positively associated with the presence of carotid plaque; however, only age and waist circumference remained statistically significant after OR adjustment.

Type 2 diabetes was not significantly associated with the presence of carotid plaques in the multivariate analyses. The linear regression model applied to c-IMT showed

a significant association with diabetes ( $P = .006$ ). Age, gender, and systolic blood pressure were also significantly associated with c-IMT (Table 5).

## Discussion

Our study showed that c-IMT and the frequency of carotid plaques were greater in type 2 diabetic subjects compared with nondiabetic controls. The main result was that 47.6% of diabetic subjects have carotid plaque and that c-IMT values were also significantly higher (0.79 mm vs 0.72 mm for the control group). The c-IMT value in the control group was in concordance with the published reference values for the Spanish population (0.71 mm for men and 0.67 mm for women).<sup>25</sup> Moreover, the frequency of carotid plaque found in the control group (66.7% of men and 47% of women >60 years old) was also in concordance with data previously published by Junyent et al.<sup>26</sup> These concordances, both in carotid plaque frequency and c-IMT average values, showed that our control group was representative of the general population.

Diabetic patients showed a mean increase of 0.067 mm compared with nondiabetic subjects, a finding that is similar to the one reported by previous studies.<sup>27</sup> Other researchers found greater differences in c-IMT between diabetic and nondiabetic subjects<sup>10</sup>; however, it should be noted that this depends largely on the characteristics of the included diabetic subjects in each study and the specific burden of cardiovascular disease in the background population. These differences were also found for the presence of carotid plaques; thereby, type 2 diabetic subjects had more than a 10% excess frequency of carotid plaques. In the multivariate model, the c-IMT was associated with diabetes ( $P = .006$ ). However, although an association between diabetes and plaque was detected (crude OR, 1.63), after adjustment for other variables, this association lost significance. This lack of significance may exist because there is a high colinearity between diabetes and other cardiovascular risk variables (Table 4).

The pathogenesis of atherosclerosis is multifactorial, which is clearly verified in diabetic patients and is associated to cardiovascular risk factors.<sup>28</sup> The IMPROVE

**TABLE 3** Carotid Plaque Distributed by Gender and Age in the 2 Study Groups

Carotid Plaque	Control Group (n = 187)		Type 2 Diabetes (n = 187)		P
	N	n (%)	N	n (%)	
Men					
<50 y	31	6 (19.4)	31	18 (58.1)	.002
51–60 y	26	11 (42.3)	26	11 (42.3)	1.000
>60 y	18	12 (66.7)	18	9 (50.0)	.310
Women					
<50 y	18	0 (0.00)	18	5 (27.8)	.016
51–60 y	45	15 (33.3)	45	20 (44.4)	.280
>60 y	49	23 (47.0)	49	26 (53.1)	.544

**TABLE 4** Lineal Regression Model for the Presence of Carotid Plaques

Carotid Plaque	Bivariate Comparisons		Unadjusted		Adjusted	
	No-Yes		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Female gender	61.9%–57.1%		0.82 (0.54–1.24)	.343	0.74 (0.46–1.20)	.229
Age	54.1–58.8		1.04 (1.02–1.07)	<.001	1.04 (1.02–1.07)	.001
Waist circumference	98.3–103.8		1.03 (1.02–1.05)	<.001	1.02 (1.01–1.04)	.013
Systolic blood pressure	129.7–136.9		1.02 (1.01–1.03)	.001	1.01 (1.00–1.02)	.216
Hypercholesterolemia	25.2%–37.2%		1.75 (1.12–2.74)	.014	1.47 (0.91–2.38)	.118
Type 2 diabetes mellitus	45%–57.1%		1.63 (1.07–2.46)	.021	1.00 (0.6–1.65)	.999

Abbreviations: 95% CI, 95% confidence interval; OR, odds ratio; SBP, systolic blood pressure.

study positively associates the c-IMT with age, gender, and smoking.<sup>29</sup> Our results are concordant with these data, except for weight and smoking; this might be explained because our sample was smaller, and further, our study did not discriminate between nonsmokers and former smokers. There is robust evidence that smoking leads to atherosclerosis.<sup>30–32</sup> As in our study, the Gutenberg-Heart study also found that men had higher c-IMT than women did; however, in that study, gender differences disappear with the increasing age of the subjects.<sup>33</sup> This effect may be due to the presence of confounding factors. Our results concerning the frequency of atheroma plaques and its association with age and waist circumference are also supported by previous findings,<sup>34</sup> although these include other significant factors that were not shown in our study. This may be due to the study design, and possibly in a more extensive population, we have found other significant risk factors.

The care management programs conducted by nurses using a multifactorial approach have been shown to reduce morbidity and mortality of those subjects at high cardiovascular risk.<sup>35</sup> The nursing role runs from the performance of diagnostic examinations and risk assessments to supporting patients during the self-care process.<sup>36</sup> A recent meta-analysis has shown that a nurse-led diabetes self-management education intervention improved glycemic control and cardiovascular risk factors.<sup>37</sup> Following this line, our unit (UDETMA) places a nurse team that leads the identification of high-risk population, especially those at very high risk (ie, diabetic patients). This nurse-led team performs relevant tasks such as cardiovascular risk assessment, identification of subclinical atherosclerosis through carotid ultrasound, and subse-

quent implementation of adapted individualized preventive measures for these subjects. Also, an annual carotid ultrasound is performed to detect changes in c-IMT or in plaque composition and morphology. The UDETMA has a preventive consultation led by experienced nurses who provide advice aimed at reducing cardiovascular risk, as well as periodic monitoring to increase compliance and motivation. This nursing care should play a central role in vascular risk management in different healthcare setting; this has been previously shown to achieve vascular risk reduction.<sup>38</sup>

Limitations of our study should be noted. First, the study involved the potential selection bias of the study population, as the patients were not randomly selected. In addition, we did not have information regarding microvascular complications of diabetes (retinopathy, nephropathy or neuropathy) that could influence the prevalence of subclinical atherosclerosis.<sup>17</sup> Therefore, we should be cautious when extrapolating the results of this study to other settings.

## Conclusion

We have been able to show that type 2 diabetes mellitus subjects from our population with no previously known cardiovascular disease show an increased subclinical carotid atherosclerotic disease. A nurse-led team is able to identify and manage these high-risk patients. Atherothrombotic disease evolves during a long clinically silent period, and for this reason, it is most likely important to strengthen all efforts aimed at early detection. Carotid ultrasound can be used as a valuable routine screening tool for the evaluation of atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus

**TABLE 5** Logistic Regression Model for Carotid Intima-Media Thickness

Carotid IMT (Each 100)	Unadjusted Effect		Adjusted Effect	
	Coefficient (95% CI)	P	Coefficient (95% CI)	P
Age	46.19 (39.59 to 52.78)	<.001	0.54 (0.41 to 0.66)	<.001
Female gender	76.24 (74.07 to 78.41)	<.001	−2.92 (−5.70 to −0.14)	.040
Weight (kg)	67.28 (60.31 to 74.25)	<.001	0.05 (−0.04 to 0.14)	.271
Systolic blood pressure (mmHg)	49.42 (40.28 to 58.56)	<.001	0.07 (−0.01 to 0.14)	.068
Smoking	76.36 (74.81 to 77.91)	<.001	1.12 (−1.89 to 4.13)	.466
Diabetes	72.30 (70.42 to 74.18)	<.001	4.04 (1.18 to 6.9)	.006

Abbreviations: 95% CI, 95% confidence interval; IMT, intima-media thickness; SBP, systolic blood pressure.



### What's New and Important

- Early detection and implementation of preventive measures for cardiovascular disease can be effectively performed by a nurse-lead team.
- Type 2 diabetes has an increased burden of subclinical carotid atherosclerosis even in the absence of previous cardiovascular clinical disease.

patients. In prevention and health promotion, the nursing role is essential, being the key professionals who conduct ultrasound procedures, identification of cardiovascular risk factors, and health education follow-up in their daily routine. It is important to conduct further studies with more accurate characterization of the population, as well as evaluate the cost effectiveness of implementing prevention programs led by nursing professionals.

### Acknowledgments

We greatly appreciate the members of the departments involved in the study for allowing patient selection and recruitment. We also thank the staff from the Mollerussa Primary Care Centre and all the current and former members of UDETMA who supported the study.

### REFERENCES

1. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971–1993. *Diabetes Care*. 1998;21(7):1138–1145.
2. Gregg EW, Gu Q, Cheng YJ, et al. Mortality trends in men and women with diabetes, 1971 to 2000. *Ann Intern Med*. 2007;147:149–155.
3. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, et al. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 2004;292:2495–2499.
4. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, et al. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. 2001;44:14–21.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685–1695.
6. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*. 2003;24:1601–1610.
7. Bots ML. Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies. *Curr Med Res Opin*. 2006;22:2181–2190.
8. Devine PJ, Carlson DW, Taylor AJ. Clinical value of carotid intima-media thickness testing. *J Nucl Cardiol*. 2006;13:710–718.
9. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, et al. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007;115:459–467.
10. Brohall G, Odén A, Fagerberg B. Carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med*. 2006;23:609–616.
11. Bernard S, Sérusclat A, Targe F, et al. Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2005;28:1158–1162.
12. de Kreutzenberg SV, Coracina A, Volpi A, et al. Microangiopathy is independently associated with presence, severity and composition of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21:286–293.
13. Lee EJ, Kim HJ, Bae JM, et al. Relevance of common carotid intima-media thickness and carotid plaque as risk factors for ischemic stroke in patients with type 2 diabetes mellitus. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28:916–919.
14. Matsumoto K, Sera Y, Nakamura H, et al. Correlation between common carotid arterial wall thickness and ischemic stroke in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2002;51:244–247.
15. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, et al. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals: does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA*. 1990;263:2893–2898.
16. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;63:2935–2959.
17. Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013;228:142–147.
18. Coll B, Betriu A, Martínez-Alonso M, et al. Large artery calcification on dialysis patients is located in the intima and related to atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:303–310.
19. Junyent M, Martínez M, Borràs M, et al. Predicting cardiovascular disease morbidity and mortality in chronic kidney disease in Spain: the rationale and design of NEFRONA: a prospective, multicenter, observational cohort study. *BMC Nephrol*. 2010;11:14.
20. Rickhamm PP. Human experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br Med J*. 1964;2:177.
21. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15:539–553.
22. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289:2560–2572.
23. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, et al. Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus (2004–2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis*. 2007;23:75–80.
24. Karim R, Hodis HN, Detrano R, et al. Relation of Framingham risk score to subclinical atherosclerosis evaluated across three arterial sites. *Am J Cardiol*. 2008;102:825–830.
25. Grau M, Subirana I, Agis D, et al. Carotid intima-media thickness in the Spanish population: reference ranges and association with cardiovascular risk factors. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:1086–1093.
26. Junyent M, Gilabert R, Núñez I, et al. Carotid ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis: distribution of intima-media thickness values and plaque frequency in a Spanish community cohort. *Med Clin (Bar)*. 2005;125:770–774.
27. Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Rodríguez-Sánchez E, et al. Carotid intima-media thickness in diabetics and hypertensive patients. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:622–625.
28. Bierman EL. George Lyman Duff memorial lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:647–656.
29. Baldassarre D, Nyssönen K, Rauramaa R, et al. Cross-sectional analysis of baseline data to identify the major determinants of

- carotid intima-media thickness in a European population: the IMPROVE study. *Eur Heart J*. 2010;31:614–622.
30. Huxley RR, Yatsuya H, Lutsey PL, et al. Impact of age at smoking initiation, dosage, and time since quitting on cardiovascular disease in African Americans and whites: the atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol*. 2012; 175:816–826.
  31. Michael Pittilo R. Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:219–230.
  32. Sanada S, Nishida M, Ishii K, et al. Smoking promotes subclinical atherosclerosis in apparently healthy men: 2-year ultrasonographic follow-up. *Circ J*. 2012;76:2884–2891.
  33. Sinning C, Wild PS, Echevarria FM, et al. Sex differences in early carotid atherosclerosis (from the community-based Gutenberg-Heart Study). *Am J Cardiol*. 2011;107:1841–1847.
  34. Fujihara K, Suzuki H, Sato A, et al. Carotid artery plaque and LDL-to-HDL cholesterol ratio predict atherosclerotic status in coronary arteries in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:452–464.
  35. Haskell WL. Cardiovascular disease prevention and lifestyle interventions: effectiveness and efficacy. *J Cardiovasc Nurs*. 2003;18:245–255.
  36. Riccio C, Sommaruga M, Vaghi P, et al. Nursing role in cardiac prevention. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2004;62: 105–113.
  37. Tshiananga JK, Kocher S, Weber C, et al. The effect of nurse-led diabetes self-management education on glycosylated hemoglobin and cardiovascular risk factors: a meta-analysis. *Diabetes Educ*. 2012;38:108–123.
  38. Sol BG, van der Bijl JJ, Banga JD, Visseren FL. Vascular risk management through nurse-led self-management programs. *J Vasc Nurs*. 2005;23(1):20–24.



#### **4.2 Left carotid vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors.**

Autors: Arcidiacono MV, **Rubin** E, Borrás M, Betriu A, Vidal T, Trujillano J, Mauricio D, Fernández E.

Publicat a Cardiovascular Ultrasound. 2015; 13:20.

La detecció precoç d'ateromatosi subclínica és important en determinants pacients amb alt risc de MCV per a la reducció de la morbiditat i la mortalitat per aquesta causa.

Encara que el GIM és el predictor més utilitzat per a la detecció d'aterosclerosi establerta, en models experimentals s'ha observat una hiperplàsia dels microvasos (vasa vasorum) en la paret de l'adventícia de les grans artèries previ a la disfunció endotelial. Aquestes troballes suggereixen que l'avaluació precoç de la neovascularització adventícia podria ser útil per detectar subjectes en risc cardiovascular abans que apareguin altres signes de malaltia ateromatosa precoç (GIM augmentat i/o presència de placa). No obstant això, els pocs estudis publicats fins ara s'han centrat exclusivament en la neovascularització de la placa d'ateroma. El primer article original sobre la quantificació de VV en l'adventícia de la paret de la caròtida comú en segments lliures de placa és la del nostre propi grup en un estudi previ en pacients amb DM2.

En aquest article, l'objectiu va ser establir el mètode de quantificació del senyal VV en l'adventícia de la caròtida comú i caracteritzar-ho en una grup de subjectes sense factors de risc CV. A més, es va pretendre avaluar si el senyal de vasa vasorum en la caròtida comú dreta i esquerra podria ser un marcador precoç de lesions ateroescleròtiques subclíniques en població sense factors de risc cardiovascular.

Es van estudiar 65 voluntaris amb edats compreses entre els 30 i els 70 anys i lliures de factors de risc cardiovascular (tabac, hipertensió, dislipèmia, i diabetis). A tots se'ls va realitzar una ecografia en mode B (ecografía convencional sense contrast) per tal d'obtenir dades de GIM i de la presència de placa, i seguidament es realitzà una ecografia

amb aplicació de contrast de microbombolles per tal de quantificar el senyal de VV en l'adventícia de l'artèria caròtida comú dreta i esquerra. En aquest article, es descriu detalladament el procediment de captura d'imatges i el mètode de lectura de quantificació del senyal VV.

Com a resultat principal es va observar que el senyal de VV de l'adventícia en la carotídia comú esquerra correlacionava amb el GIM en aquest mateix territori i també amb l'edat. Aquesta alta correlació, en subjectes sense factors de risc CV, suggereix que la quantificació dels VV en l'adventícia carotídia pot ser un marcador sensible i fiable per a la detecció de malaltia ateromatosa subclínica, i també un potencial instrument de monitorització de l'eficàcia de les intervencions dutes a terme sobre els factors de risc CV.



RESEARCH

Open Access

# Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors

Maria Vittoria Arcidiacono<sup>1,2,3\*</sup>, Esther Rubinat<sup>2,3,4</sup>, Mercè Borràs<sup>1</sup>, Angels Betriu<sup>1,2,3</sup>, Javier Trujillano<sup>3,5</sup>, Teresa Vidal<sup>1,2</sup>, Didac Mauricio<sup>2,3,6</sup> and Elvira Fernández<sup>1,2,3</sup>

## Abstract

**Objective:** The early identification of the onset of subclinical atheromatosis is essential in reducing the high mortality risk from cardiovascular disease (CVD) worldwide. Although carotid intima-media thickness (cIMT) is the most commonly used early predictor of ongoing atherosclerosis, an experimental model of atherosclerosis, demonstrated that increases in adventitial microvessels (vasa vasorum (VV)) precede endothelial dysfunction. Using the reported accuracy of contrast-enhanced ultrasound (CEU) to measure carotid adventitial VV, this study assessed whether measurements of carotid adventitial VV serve as a marker of subclinical atherosclerotic lesions in a control population with none of the classical risk factors for CVD.

**Methods and results:** Measurements of cIMT (B-mode ultrasound) and adventitial VV (CEU) were conducted in 65 subjects, 30–70 years old, 48% men, with none of the classical risk factors for CVD. Adventitial VV strongly correlated with its own cIMT only in the left carotid artery. Importantly, the left carotid adventitial VV directly correlated with age.

**Conclusions:** The increases with age in left carotid adventitial VV in individuals with zero risk for atheromatosis suggest that the measurement of carotid adventitial VV could be an accurate and sensitive marker for the diagnosis of subclinical atheromatosis and therefore a prominent tool for monitoring the efficacy of anti-atheromatous therapies.

**Keywords:** Atheromatosis, Vasa vasorum, Contrast-enhanced ultrasound, Carotid arteries, Adventitial layer

## Introduction

Atherosclerosis is the leading cause of death in the general population worldwide [1]. The ability to identify the atherosclerotic process at early stages is of great value for attenuating the risk of adverse cardiovascular disease (CVD) events.

At present, carotid intima-media thickness (cIMT) is the earliest and most widely used predictor of atheromatosis. Indeed, not only is cIMT associated with several traditional risk factors including smoking, high cholesterol, high blood pressure, and high glucose [2,3], but

more significantly, cIMT improves the prognostic risk prediction of either one or more than one of any of these traditional risk factors, particularly in women [4]. Importantly, ultrasonographic measurements provide an accurate estimation of cIMT. To this point, Pignoli et al. find no significant differences between the ultrasonographic measurements of the IMT in the common carotid arteries and those determined histologically [5].

Important for the identification of the pathophysiology underlying cIMT was the immunohistochemical analysis of human carotid atherosclerotic lesions. At pre-atheroma stages, microvessels originating from the adventitial layer are present in the intima layer, while they are absent in the normal intima and also in atheromatous lesions that are independent of intimal thickening [6,7]. These microvessels are known as vasa vasorum (VV), and they are

\* Correspondence: arcivicki@hotmail.com

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>2</sup>Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

physiologically located in the adventitial layer providing nourishment to medium and large vessels including aorta, coronary, femoral, and carotid arteries. Experimental evidence supports a role of the neoangiogenesis originating from the adventitial layer in the initiation and progression of the atherosclerotic process [8]. This initial demonstration that hypercholesterolemia increases adventitial VV before the development of atherosclerotic lesion in porcine coronary arteries is further supported by the studies by Herrmann et al., using three-dimensional micro-computed tomography (CT) [9]. In the coronary arteries of pigs fed a hypercholesterolemic diet, the marked increases in the density of adventitial VV precede endothelial dysfunction, the first alteration leading to atherosclerosis [9]. These experimental findings suggest that imaging VV in the adventitia *in vivo* could identify stages in the development of atherosclerosis prior to the well-recognized increases in cIMT, thus favoring an early identification of patients with a higher risk of cerebrovascular events.

Contrast-enhanced ultrasound (CEU) has been introduced as a useful, non-invasive and inexpensive technique for studying VV in the carotid arteries [10]. Indeed, several studies have identified plaque neovascularization using CEU, which were histologically confirmed after endarterectomy [11-13]. However, these studies were prevalently focused on intraplaque neovascularization. In order to use the degree of neovascularization necessary for CEU assessment to predict cerebrovascular risk, a better understanding of the physiological/pathological amount of VV in the carotid adventitial layer was necessary. Indeed, the first report of an increase of the periadventitial VV network in patients with carotid stenosis of at least >50%, compared with that in patients with no carotid stenosis, utilized a combination of sonographic contrast agent and B-flow images [14]. More recently, the direct *in vivo* visualization of the adventitial neovascularization by CEU has been reported: values from type 2 diabetic patients showed a higher adventitial vascularization in comparison with the values from healthy subjects. Furthermore, diabetic patients affected by retinopathy showed a higher adventitial VV than did patients not affected by retinopathy [15].

Therefore, the aim of the study was to study a group of healthy volunteers with none of the classical risk factors for CVD (smoking, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes) to assess the physiological density of adventitial VV.

## Materials and methods

### Study subjects

Subjects with none of the classical risk factors for cardiovascular disease were enrolled to obtain a physiological estimate of adventitial VV content prior to the development of atheromatosis. All of the 65 enrolled

subjects were non-smokers, and with morphometric and biochemical parameters within the normal range. The age range was between 30 and 70 years, and 48% were men. During enrollment, some subjects were excluded for the following reasons: 1) They met the exclusion criteria for the administration of the contrast agent including: a) recent cardiac instability, b) recent (<7 days) coronary intervention, c) class III or IV heart failure, d) severe pulmonary hypertension, or e) allergic reaction to sulphur hexafluoride, the main component of the contrast agent; 2) The detection of a carotid plaque during B-mode ultrasound. This protocol was approved by the ethical committee at the University Hospital Arnau de Vilanova (HUAV, Lleida, Spain). After being informed of the goals and protocols, all subjects signed consents before morphometric parameter acquisition and the drawing of blood.

### Morphometric and biochemical parameters

Morphometric parameters were obtained by standard methods. Briefly, weight and height were measured with a digital weight scale with a stadiometer. Body mass index (BMI) was then calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. The waist circumference (WC) was measured in centimeters at the umbilicus level. Blood pressure (BP) was measured as the average of triplicate values obtained with an automated oscillometer (Omron HEM-705CP) while patients were seated and had rested for ten minutes. Pulse pressure (PP) was calculated as the difference between mean systolic (SBP) and mean diastolic blood pressure (DBP). Biochemical parameters (glucose, total cholesterol (Cholesterol), HDL and LDL cholesterol, and triglycerides (TG)) were obtained after overnight fasting using the standard methods of the laboratory of Clinical Biochemistry at the HUAV. Ultrasensitive C-reactive protein (CRP) was measured in the same laboratory using an immunoturbidimetric assay (Roche Diagnostic on a Hitachi automated analyzer).

### Standard and contrast-enhanced carotid ultrasound

All subjects (supine position) underwent a B-mode ultrasound examination of the extra-cranial carotid arteries including the common, bulb, internal, and the external carotid artery (CA). A prior axial exploration was followed by a longitudinal exploration for the evaluation of atheromatous plaque presence and for measurements of cIMT of the far wall of the common artery. The cIMT was calculated as the gray-scale layer comprised within the luminal blood and the carotid adventitia layer at the level of 1 cm proximal to the bifurcation. Two independent readers (MVA, TV) read cIMT and reproducibility, according to the obtained intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.822 (range 0.745-0.877), was classified as good

(range 0.7-0.9). Next, subjects underwent the CEU imaging procedure using the contrast agent Sonovue (Bracco Spa, Milan, Italy), a phospholipidic shell containing sulfure hexafluoride. A Sonovue vial was solubilized in 5 ml of saline, and a 2.5 ml bolus was injected first, followed by 10 ml of a saline flush, in the antecubital vein for each CA explored (20-gauge needle to avoid microbubbles rupture). According to the manufacturer's information, the contrast agent has no adverse effects at this dose and was sufficient to obtain a strong and clear signal for a 1-minute image recording. The CEU imaging was performed with a Siemens Sequoia 512 using the 15L8W linear array probe (7 Mhz) with a low mechanical index of 0.18. The Sequoia 512 is equipped with Cadence contrast Pulse Sequencing (CPS) technology able to combine the nonlinear fundamental and higher harmonic nonlinear fundamental contrast signals determining a high sensitivity and specificity of contrast agent detection. During imaging acquirement it is possible to specifically separate "tissue only", "contrast agent only" or "both together", specifically we worked on "CA" methodology that means "contrast agent only". All the videos were stored for a posterior reading using the Siemens software Syngo. As previously described [15], adventitial VV content in the far adventitial layer was calculated as the average of the ratios of the intensities in the 2 mm above the intima-lumen boundary and the intensities of the 2 mm below the media-adventitia boundary of the common carotid artery 1 cm proximal to the bifurcation. The final result (VV signal) was calculated as the average of 10 to 20 ratios calculated for each diastolic frame in which both the lumen intensity and the adventitial intensity was high and stable within a 1 minute video recording. As reported [15], the intraobserver variability was classified as very good (CCI = 0.930; 0.84-0.970); while, the reproducibility of the method, calculated on two readers (AMV, RE), was classified as good (ICC = 0.870; 0.780-0.920), comparable to the reproducibility of cIMT measurements. As reported in [16] we excluded from reading videos in which signals were observed in the far arterial wall before contrast injection therefore avoiding artefact images. Additional reasons for reading exclusion were: 1) the contrast agent disappeared rapidly thus impeding to be properly visualized; or 2) the presence of an ultrasound shadow in the area of the carotid under analysis that impeded the reading.

#### Statistical analysis

Data analysis was performed by an investigator totally blinded to the characteristics of the patients. The SPSS v17 software was used for analysis. Morphometric and biochemical values, as well as cIMT and VV ratio, were expressed as mean  $\pm$  standard deviation if there was no significant deviation from normal distribution, or as median (interquartile range) if non-normal distribution was

observed. Normal distribution was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test. The Mann-Whitney test examined the statistical difference of the parameters in the two genders. The Spearman's rank correlation coefficients assessed the correlation between the adventitial VV ratio and the cIMT and between the VV ratio and the biochemical or anthropometric parameters. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

#### Results

Subject characteristics, stratified by gender, are shown in Table 1. According to the inclusion criteria, age distribution was similar between women ( $50 \pm 10$ ) and men ( $48 \pm 11$ ), and all examined parameters were within the normal physiological range. Gender differences were observed for serum HDL and LDL levels (women:  $58.8 \pm 11$  vs men:  $49.1 \pm 12$ ,  $p = 0.003$ , and women:  $106.3(94-120)$  vs men:  $122.6(97-136)$ ,  $p = 0.032$ , respectively), and, as expected, the waist circumference (WC) was lower in women than in men ( $85.7 \pm 10$  vs  $91.9 \pm 8$ ,  $p = 0.009$ , respectively).

Ultrasound measurements of cIMT and of adventitial vasa vasorum (VV) content are shown in Table 2. As shown in panel A, the mean cIMT value of the common CA was  $0.646 \pm 0.107$ , and no difference was observed between women and men ( $0.636 \pm 0.107$  vs  $0.656 \pm 0.108$ ). The mean VV ratio (panel B) was  $0.577 \pm 0.119$  and there was no difference in VV ratio between women and men ( $0.560 \pm 0.104$  vs  $0.594 \pm 0.133$ ). In addition, there were no statistical differences between cIMT and VV ratio in the right and the left CA of both, women and men.

**Table 1 Baseline characteristics of the study population**

	Female (n = 34)	Male (n = 31)	p-value
Age (years)	$50 \pm 10$	$48 \pm 11$	0.626
Glucose (mg/dl)	$91.7 \pm 10$	$93.9 \pm 7$	0.092
Cholesterol (mg/dl)	$177.3 \pm 26$	$181.4 \pm 27$	0.275
HDL-Cholesterol (mg/dl)	$58.8 \pm 11$	$49.1 \pm 12$	<b>0.003</b>
LDL-Cholesterol (mg/dl)*	106.3 (94-120)	122.6 (97-136)	<b>0.032</b>
TG (mg/dl)*	56.0 (48-68)	65.0 (47-90)	0.205
CRP (mg/l)*	0.8 (0.5-1.7)	0.8 (0.5-2.3)	0.568
SBP (mmHg)	$120.3 \pm 14$	$124.4 \pm 11$	0.106
DBP (mmHg)	$74.5 \pm 8$	$74.9 \pm 8$	0.989
PP (mmHg)	$45.8 \pm 10$	$48.6 \pm 9$	0.264
WC (cm)	$85.7 \pm 10$	$91.9 \pm 8$	<b>0.009</b>
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	$24.8 \pm 4$	$25.2 \pm 2$	0.290

\*Identified variables with non-normal distribution. Values of these variables are described with Median (IQR). For variables with no significant deviations from normal distribution, values are provided as mean  $\pm$  standard deviation. Mann-Whitney test p-values to test differences between females and males are provided given the small sample size. Statistically significant p-values are indicated in bold.

TG: triglycerides; CRP: C-reactive protein; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; PP: pulse pressure; WC: waist circumference; BMI: body mass index.



**Table 2 cIMT and carotid adventitial VV values**

<b>A</b>			
	cIMT (mm)	Right cIMT (mm)	Left cIMT (mm)
Female	0.636 ± 0.107	0.626 ± 0.102	0.646 ± 0.130
Male	0.656 ± 0.108	0.641 ± 0.127	0.671 ± 0.127
Females vs. Males*	0.340	0.608	0.412
Total	0.646 ± 0.107	0.633 ± 0.114	0.658 ± 0.128
<b>B</b>			
	VV (ratio)	Right VV (ratio)	Left VV (ratio)
Female	0.560 ± 0.104	0.568 ± 0.130	0.544 ± 0.146
Male	0.594 ± 0.133	0.598 ± 0.208	0.596 ± 0.144
Females vs. Males*	0.162	0.403	0.270
Total	0.577 ± 0.119	0.582 ± 0.171	0.573 ± 0.146

Values are expressed as mean ± standard deviation after confirming no significant deviation from the normal distribution. (\*) Mann-Whitney test p-values to test differences between females and males are provided given the small sample size.

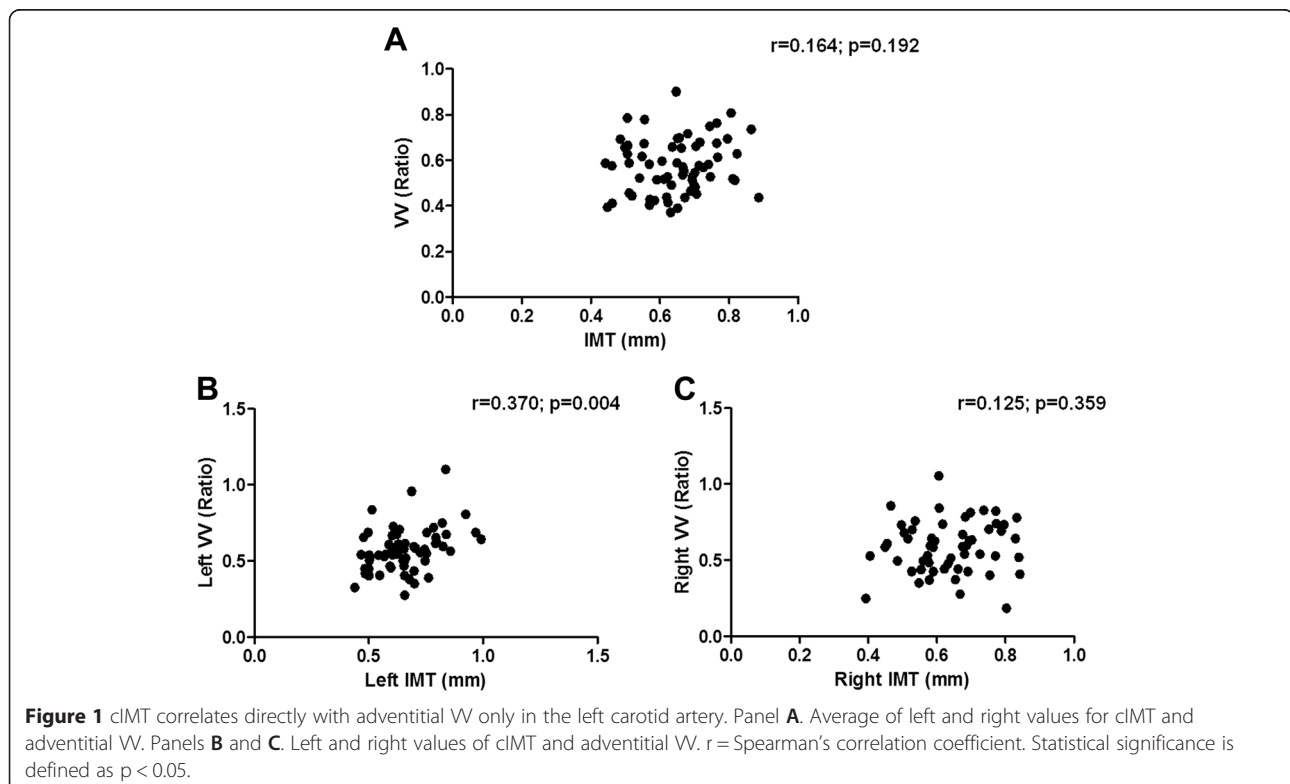
As shown in Figure 1A, no correlation was observed between the average left and right cIMT and the average left and right of adventitial VV ratio of all 65 subjects. Interestingly, although no correlation was observed between the right cIMT and the right carotid adventitial VV ( $r = 0.125$ , Figure 1 panel C), the left cIMT significantly correlated with the left carotid adventitial VV ( $r = 0.370$ ,  $p = 0.004$ , Figure 1 panel B).

Moreover, as shown in Table 3, only age correlated with the left VV ratio ( $r = 0.313$ ,  $p = 0.015$ ). None of the biochemical or anthropometric parameters examined correlated with the adventitial VV ratio, including when separately considering the right and the left CA.

## Discussion

This study in healthy individuals with no classical risk factors for atheromatosis, in which exclusively the left carotid adventitial VV density correlated with both age and left cIMT, supports the accuracy and sensitivity of measurements of the left carotid adventitial VV density as an early marker of subclinical atheromatosis.

Indeed, using a population without clinical atheromatosis and with none of the classical risk factors for the development of atheromatous disease, a statistical significant correlation between the left cIMT and the left VV ratio was observed ( $r = 0.370$ ;  $p = 0.004$ ). No correlation was observed in the right side, or when considering the VV ratio and the cIMT as the average of the values of the left and the right carotid arteries. The latter finding is similar to that reported by Sampson et al. in patients with minimal atherosclerosis, which demonstrates no association between cIMT and adventitial VV when considering the average of both CA (left and right) [17]. Therefore, the results of the current study highlight the importance of examining the left and the right CA independently in patients not affected by atheromatosis.



**Table 3 Correlation between carotid adventitial VV ratio and the biochemical or anthropometric parameters**

	Right VV Ratio	Left VV Ratio
Age (years)	-0.079 (0.563)	0.313 (0.015)*
Glucose (mg/dl)	-0.129 (0.344)	-0.150 (0.252)
Cholesterol (mg/dl)	0.135 (0.321)	-0.144 (0.272)
HDL-Cholesterol (mg/dl)	0.037 (0.787)	0.035 (0.789)
LDL-Cholesterol (mg/dl)	0.063 (0.643)	-0.083 (0.530)
TG (mg/dl)	0.147 (0.281)	-0.139 (0.291)
CRP (mg/l)	0.026 (0.850)	-0.188 (0.150)
SBP (mmHg)	-0.007 (0.961)	0.115 (0.383)
DBP (mmHg)	0.042 (0.762)	0.038 (0.773)
PP (mmHg)	-0.079 (0.566)	0.138 (0.296)
WC (cm)	0.172 (0.228)	0.038 (0.785)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.018 (0.891)	-0.074 (0.593)

Spearman's correlation coefficient (p-value). (\*) p < 0.05.

TG: triglycerides; CRP: C-reactive protein; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; PP: pulse pressure; WC: waist circumference; BMI: body mass index.

Until now, most clinical studies have focused on the contribution of increases in neovascularization (vasa vasorum) to plaque instability [18]. Furthermore, the few post-mortem studies in humans showing increases in VV in the plaque are insufficient to support the contribution of increases in adventitial VV to initiate the atherosclerotic process that was observed in experimental hypercholesterolemic settings [9]. The direct correlation between the left VV ratio and the left cIMT demonstrated herein, and our recent demonstration that, despite similar values of cIMT, diabetic patients with retinopathy (angiogenesis) presented a higher carotid adventitial VV ratio [15] support the experimental findings in which increases in adventitial VV precede the increases in cIMT [9].

The decision to distinguish between the VV density in left and right CAs was based upon Lemne's findings of higher values of the cIMT on the left CA in normotensive individuals [19] and more importantly, by the fact that the association between cardiovascular risk and vascular anatomy is not uniform for the thickness of intima-media layer [20] or for the presence of plaque [21,22]. Furthermore, this anatomical difference is attenuated with the occurrence of atherosclerotic risk factors such as hypertension. Indeed, subjects with mean blood pressure of 90 mmHg (or lower) had a higher cIMT in the left than in the right CA, while, when mean arterial blood pressure was higher than 90 mmHg, not only did age not affect cIMT, but also the differences in wall thickening between the left and the right CA attenuated [23]. These findings are in line with the Rotterdam Study in which, in a population aged 55 or over, the differences between participants with and without

hypertension are significant only in the right CA, therefore suggesting the possibility that atherosclerotic lesions develop in the left side earlier than in the right side [24]. A potential explanation for this difference is that the left CA originates directly from the aortic arch and is therefore exposed to a constantly higher shear stress [25]. The fact that atherosclerotic lesions appear earlier in the left than in the right CA could in part explain our finding of a correlation between the adventitial VV and the cIMT only in the left CA.

None of the measured biochemical or anthropometric parameters, all of which are highly involved in the development of atheromatous disorders, except for age correlated with adventitial VV ratio. Since aging is the natural determinant of a higher prevalence of atheromatous lesions in otherwise healthy individuals, our demonstration of no association of the right adventitial VV with age supports the high sensitivity of CEU measurements of left adventitial VV density for the diagnosis of sub-clinical atheromatosis.

A limitation of the present study is the small number of enrolled patients due to the strict inclusion criteria. Furthermore the strong direct correlation between age and left adventitial VV in this population with zero risk for atheromatosis, underscores the need to conduct a study with similar inclusion criteria but with the appropriate statistical power to obtain reference values of VV density in the left and right carotids within a gender and also at different ranges of age. Importantly, the present study provides the mandatory data to infer the appropriate sample size to accurately establish physiological values of adventitial VV density. This is a mandatory first step to evaluate the abnormalities in adventitial VV in patients at a higher risk for cardiovascular disease.

## Conclusions

In conclusion, our findings suggest that CEU measurements of carotid adventitial VV provide a novel marker to explore the atheromatous development process and in monitoring disease progression and the response to anti-atheromatous strategies. Additional studies in populations considered at a higher CV risk, including smokers or individuals with hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, or renal disease are needed to further explore the distinct contribution of increases in left or right adventitial VV ratio to the progression of the atheromatous process and to its regression in response to anti-atheromatous therapies.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

MVA, DM and EF designed the study. MVA, ER and TV recruited the study subjects and performed the B-mode and contrast-enhanced ultrasound. MVA was in charge of the cIMT and adventitial VV ratio reading, and ER contributed in verifying the reproducibility of the CEU method. MVA drafted the manuscript and ER, MB, AB, JT, DM and EF contributed to the writing reviewing and the final editing of the manuscript. JT and MVA worked on the statistic section. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgment**

We thank Dr. Adriana Dusso for critical reading of the manuscript and valuable suggestions and Montserrat Martinez-Alonso (Department of Statistics, IRB Lleida) for her assistance in the Statistical Analysis. This study was funded by grants No. PI09/1999; No. PS09/01035 and PI12/00183, from the Health Institute Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain.

**Author details**

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain. <sup>2</sup>Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain. <sup>3</sup>Institut de Recerca Biomedica de Lleida, University of Lleida, Avda Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain. <sup>4</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain. <sup>5</sup>Intensive Care Unit, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Avda Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain. <sup>6</sup>Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet S/N, 08916 Badalona, Spain.

Received: 4 December 2014 Accepted: 9 April 2015

Published online: 17 April 2015

**References**

1. Beaglehole R, Bonita R. Global public health: a scorecard. *Lancet*. 2008;372(9654):1988–96.
2. Urbina EM, Srinivasan SR, Tang R, Bond MG, Kieleyka L, Berenson GS. Impact of multiple coronary risk factors on the intima-media thickness of different segments of carotid artery in healthy young adults (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol*. 2002;90(9):953–8.
3. Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Chen W, et al. Increased subclinical atherosclerosis in young adults with metabolic syndrome: the Bogalusa Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(3):457–63.
4. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993. *Am J Epidemiol*. 1997;146(6):483–94.
5. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986;74(6):1399–406.
6. Zhang Y, Cliff WJ, Schoeffl GI, Higgins G. Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1993;143(1):164–72.
7. Jeziorska M, Woolley DE. Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: its potential contribution to plaque development. *Hum Pathol*. 1999;30(8):919–25.
8. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes Jr DR, Schwartz RS, et al. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1551–6.
9. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes Jr DR, Richardson DM, Ritman EL, et al. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*. 2001;51(4):762–6.
10. Feinstein SB. Contrast ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum and atherosclerotic plaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(2):236–43.
11. Vicenzini E, Giannoni MF, Puccinelli F, Ricciardi MC, Altieri M, Di Piero V, et al. Detection of carotid adventitial vasa vasorum and plaque vascularization with ultrasound cadence contrast pulse sequencing technique and echo-contrast agent. *Stroke*. 2007;38(10):2841–3.
12. Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, Marrocco-Trischitta MM, Melisurgo G, Mauriello A, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries: correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(3):223–30.
13. Giannoni MF, Vicenzini E, Citone M, Ricciardi MC, Irace L, Laurito A, et al. Contrast carotid ultrasound for the detection of unstable plaques with neoangiogenesis: a pilot study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;37(6):722–7.
14. Magnoni M, Coli S, Marrocco-Trischitta MM, Melisurgo G, De Dominicis D, Cianflone D, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of periadventitial vasa vasorum in human carotid arteries. *Eur J Echocardiogr*. 2009;10(2):260–4.
15. Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, Ortega E, Betriu A, Hernandez M, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013;228(1):142–7.
16. Arcidiacono MV, Rubinat E, Ortega E, Betriu A, Fernandez E, Mauricio D. Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):459–61.
17. Sampson UK, Harrell FE, Jr., Fazio S, Nwosu S, Mercaldo N, Mensah GA, Davidson MH, Coll B, Feinstein SB: Carotid Adventitial Vasa Vasorum and Intima-Media Thickness in a Primary Prevention Population. *Echocardiography* 2014.
18. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2316–25.
19. Lemne C, Jogestrand T, de Faire U. Carotid intima-media thickness and plaque in borderline hypertension. *Stroke*. 1995;26(1):34–9.
20. Polak JF, Person SD, Wei GS, Godreau A, Jacobs Jr DR, Harrington A, et al. Segment-specific associations of carotid intima-media thickness with cardiovascular risk factors: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Stroke*. 2010;41(1):9–15.
21. Rubba P, Panico S, Bond MG, Covetti G, Celentano E, Iannuzzi A, et al. Site-specific atherosclerotic plaques in the carotid arteries of middle-aged women from southern Italy: associations with traditional risk factors and oxidation markers. *Stroke*. 2001;32(9):1953–9.
22. Tell GS, Howard G, McKinney WM. Risk factors for site specific extracranial carotid artery plaque distribution as measured by B-mode ultrasound. *J Clin Epidemiol*. 1989;42(6):551–9.
23. Chaubey S, Nitsch D, Altmann D, Ebrahim S. Differing effect of modifiable cardiovascular risk factors on intima-media thickening and plaque formation at different sites of the arterial vasculature. *Heart*. 2010;96(19):1579–85.
24. Bots ML, Hofman A, de Bruyn AM, de Jong PT, Grobbee DE. Isolated systolic hypertension and vessel wall thickness of the carotid artery. The Rotterdam Elderly Study. *Arterioscler Thromb*. 1993;13(1):64–9.
25. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983;53(4):502–14.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



### **4.3 Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients.**

Autors: Arcidiacono MV, **Rubinat E**, Ortega E, Betriu A, Fernández E, Mauricio D.

Publicat a *Atherosclerosis*. 2013;229: 459-61.

Es tracta d'un comentari invitat que tenia com a objectiu respondre diferents qüestions metodològiques, plantejades en un l'article que Van der Oord et al. publicà en referència al mètode de lectura dels VV descrit en un estudi previ del nostre grup de recerca en pacients amb DM2 [34]. Aquesta aportació va obligar al nostre grup a fer una revisió a fons de la metodologia pròpia, i de la literatura prèvia, i va ser publicada com a comentari invitat per l'editor de la revista *Atherosclerosis*.

Van der Oord et al. exposa que un dels principals problemes en l'avaluació de la microcirculació de la paret arterial carotídia mitjançant ecografia amb contrast és l'artefacte conegut com a "pseudo-enhancement", descrit anteriorment en dos articles (ten Kate GL, et al. i Thapar A, et al.).

La resposta del nostre grup als arguments de Van der Oord es basa principalment en els següents punts:

- En els nostres estudis es van excloure tots els subjectes que presentaven alguna característica del vas que dificultava l'ecografia convencional i/o amb contrast.
- Per tal d'evitar senyals addicionals més enllà de l'adventícia, el nostre mètode només mesura la intensitat de senyal en els 2mm per sota el límit de la íntima-lumen.
- No hi cap evidència que els productes resultants del procés de glucosilació avançada depositats en la paret arterial donin lloc a un augment de l'ecogenitat.
- La persona experta en la lectura de les imatges va ser totalment cega a les característiques dels subjectes.

- L'aparell ecogràfic i el software de lectura que vam utilitzar és diferent del que van utilitzar en els articles als que Van der Oord et al. fa referència, i no produeix el fenomen del "pseudo-enhancement" a la paret posterior.

Es conclou que el mètode desenvolupat pel nostre grup és vàlid i fiable, i no presenta l'artefacte "pseudo-enhancement" en la zona on es realitza l'avaluació del senyal de contrast. Per tant, també ho són els resultats obtinguts en els nostres estudis.



## Invited commentary

## Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients



Maria Vittoria Arcidiacono<sup>a,b,c</sup>, Esther Rubinat<sup>b,c,d</sup>, Emilio Ortega<sup>e</sup>, Angels Betriu<sup>a,b,c</sup>, Elvira Fernández<sup>a,b,c</sup>, Didac Mauricio<sup>b,c,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>b</sup> Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>c</sup> Institut de Recerca Biomedica de Lleida, University of Lleida, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>d</sup> Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>e</sup> Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clinic, IDIBAPS, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 May 2013

Accepted 13 June 2013

Available online 24 June 2013

#### Keywords:

Vasa vasorum

Carotid ultrasound

Contrast-enhanced ultrasound imaging

Type 2 diabetes mellitus

Atherosclerosis

We read with great interest the comments of Van der Oord et al. on our recently published study [1]. Unfortunately, at the time at which our study was designed and conducted [2], the two interesting articles on the artifacts produced by pseudo-enhancement during contrast-enhanced ultrasound (CEUS) imaging of the carotid arteries had not yet been issued [3,4]. We acknowledge that a pseudo-enhancement artifact may exist under several conditions, as reported by these authors [3,4], but as they pointed out, there are currently no commercially available tools to avoid this artifact. We are hereby contributing additional comments and data to address the issues raised by Van der Oord and colleagues.

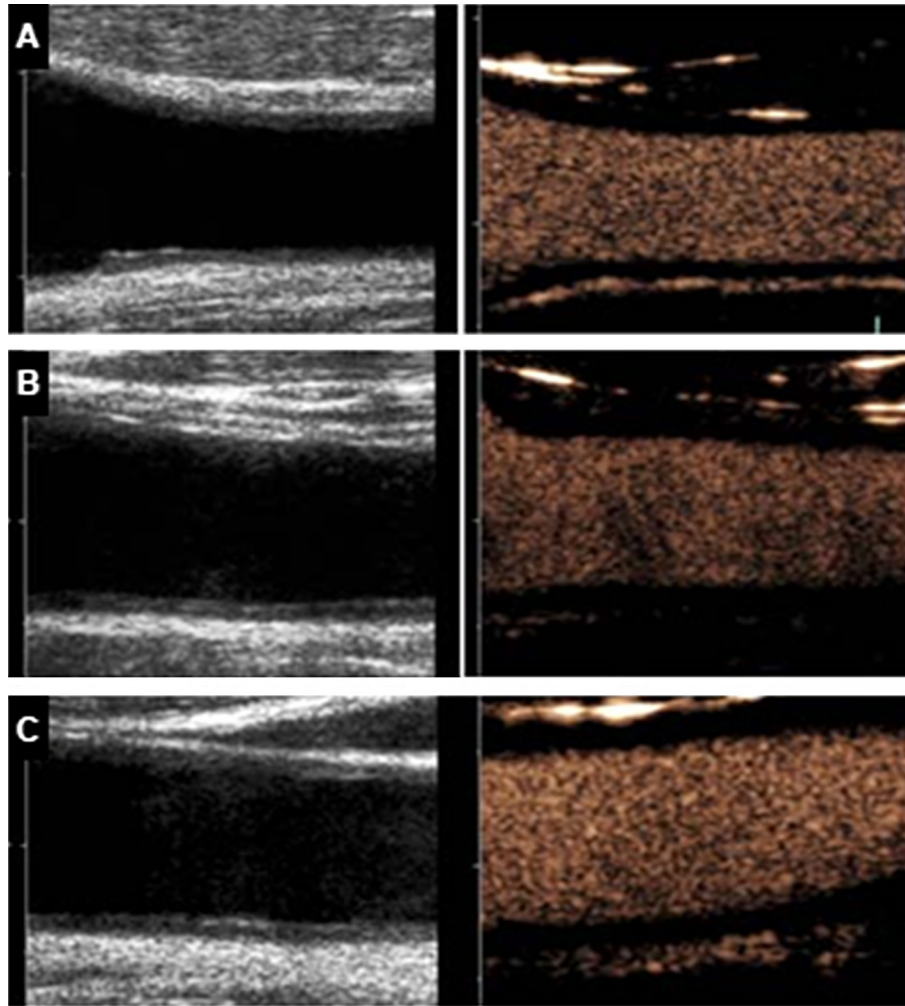
We carefully revised the reports on pseudo-enhancement, considering previous data from other researchers and our own procedures and database of images. Concerning the procedure used in our studies, several issues deserve consideration. First, we carefully selected the patients included in our study. As explained in the

description of the methods [2], the subjects who showed any vessel conditions that precluded adequate conventional and/or contrast-enhanced ultrasound image acquisition were excluded. These conditions included any increased echogenic signal in the far arterial wall during CEUS imaging (cadence pulse sequencing) before contrast injection; this exclusion was made to avoid any possibility of background artifact images. In addition, only the subjects with consistent bilateral image acquisition were included. These inclusion criteria are stricter than those applied in previous studies. Fortunately, we excluded the subjects who presented vessel wall conditions that otherwise may have produced potential artifact images similar to those reported in studies describing the pseudo-enhancement effect [3,4]. The images in those two papers clearly indicate that the areas with high intensity observed during B-mode ultrasound coincided with high signals on CEUS imaging that were considered to represent pseudo-enhancement. Similar results were not observed for the subjects included in our study when we thoroughly re-assessed all of the images, following the recommendations of the authors of the commentary [1]. We are hereby providing additional examples of images in which this phenomenon is not observed (Fig. 1). The readers are encouraged to compare the images of our procedure with the pseudo-enhancement images

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.036>.

\* Corresponding author. Department of Endocrinology & Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain. Tel.: +34 934978860; fax: +34 934978497.

E-mail address: [didacmauricio@gmail.com](mailto:didacmauricio@gmail.com) (D. Mauricio).



**Fig. 1.** Conventional (left) and contrast-enhanced (right) ultrasound images of the common carotid artery in 3 different subjects. Each panel (A, B and C) corresponds to a different subject. The areas with high intensity in the far wall on the conventional B-mode images do not correspond to those of the CEUS images. For example, panel B shows a higher intensity in the far wall on conventional ultrasound examination than does panel A; these high intensity images (panel B) do not correspond with higher CEUS signals (less intense in B than in A). As observed in all 3 examples, each of the 3 patients exhibited a different signal. The CEUS images also clearly show the intima-media complex and delineate the media-adventitia and intima-lumen boundaries. There are also highly intense signals apparent in the near wall of the carotid arteries (right).

of previous reports [3,4]. These images do not show the expected artifact signal, not only from the adventitia, but also from all of the other layers of the arterial wall and the surrounding tissues. Furthermore, it should be noted that to avoid any additional signal beyond the adventitia, we calculated the vasa vasorum (VV) ratio using a method that included measuring the intensity of the signal only in the 2 mm below the intima-lumen boundary, as explained in the methods section [2].

In contrast to previous reports, many of the images acquired in our study during the carotid contrast-enhanced ultrasound examination exhibited a high non-specific signal in the near wall of the carotid artery that could be regarded as artifacts. The readers can easily identify these hyperechogenic signals in both Fig. 1 and in the Supplemental Fig. 1 provided in the original article [2]. The presence of these images prevented us from assessing the VV signal at this level. It is important to remember that, as for the assessment of the intima-media thickness, the optimal ultrasound measurement of the contrast is obtained on the far wall of the artery [5].

Van der Oord et al. admitted that we were able to show an important difference in the VV signal in diabetic patients with diabetic retinopathy. Nevertheless, they hypothesized that the

increased signal may be explained by a stiffening of the arterial wall due to the accumulation of advanced glycation end products, producing a more intense artifact. However, they do not provide any evidence to support this explanation. Neither advanced glycation end products nor arterial stiffening have been described as sources of artifacts in CEUS. Moreover, any accumulated advanced glycation end products would also be present in the intima and especially the media layer as well; however, ultrasound imaging in our hands demonstrated the absence of an artifact signal on these layers of the carotid wall. Alternatively, there is evidence from previous studies that the adventitial signal arises from the contrast in the VV. A study in an experimental swine model by Schinkel et al. indicated that the increased contrast signal measured in the adventitia using CEUS imaging corresponds to an increased density and extent of the VV network of the artery wall according to histopathological examination [6]. Histopathological studies confirmed similar findings in humans [7].

As an increased pseudo-enhancement artifact is to be expected on plaques, it is paradoxical that we found so few plaques that yielded an intraplaque contrast signal [2]. After careful assessment of the recorded material of our study, we were unable to identify

any images of artifact pseudo-enhancement on the plaque tissues. Therefore, in our hands, the pseudo-enhancement artifact is also irrelevant for plaque tissue.

A final issue raised by van der Oord et al. is that the artifact effect produced an overestimation of the density of the VV. It is important to note here that the reader of all of the images in our study was blinded to the subject characteristics. Additionally, there is no evidence that any artifact effect would have been overestimated in subjects with diabetes with or without retinopathy but not in the non-diabetic controls. If it was a factor, this overestimation effect should have influenced the image reading process in all of the study subjects. Therefore, the differences observed in our study remain a solid finding.

Finally, we strongly feel that the CEUS imaging methodology merits further research, in addition to a standardization of the procedures (from the acquisition of images to their analysis and interpretation). We have been unable to reproduce some of the effects described by Ten Kate et al. [3]. For example, in contrast to the observations of the authors in a previous work, we observed a lag period between the detection of the signal in the carotid lumen and the appearance of the contrast signal in the adventitia. Therefore, differences arising from the use of various tools and methods to measure the CEUS signals should not be neglected. It is especially important to note that the two studies that described the contrast artifact in carotid arteries used the same device (including its specific software), and this device is different from the one used in our study. As described for the intima-media thickness measurement [5], also for CEUS imaging differences between sonographers may have a much larger effect than do differences between readers. Future studies should test intraindividual differences using various devices and protocols. Therefore, we are in need of new research aimed at improving all CEUS method variations.

Based on the preceding points, we can conclude that our methodology allowed us to measure the contrast intensity on the adventitia, which is mainly explained by an increased adventitial

VV in the diabetic subjects. Therefore, we continue to confirm the main conclusion that type 2 diabetic patients with retinopathy show increased angiogenesis of the VV of the common carotid artery.

### Conflict of interest

All authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

### Acknowledgments

This research was funded by grants No. PS09/01035 and No. PS09/01999 from Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Science and Innovation, Spain.

### References

- [1] Van der Oord SCH, Renaud G, Bosch JG, de Jong N, van der Steen AFW, Schinjel AFL. Far wall pseudo-enhancement: a neglected artifact in carotid contrast-enhanced ultrasound. *Atherosclerosis* 2013 [in press].
- [2] Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, Ortega E, Betriu A, Hernández M, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2013;228:142–7.
- [3] Ten Kate GL, Renaud GGJ, Akkus Z, van der Oord SCH, Ten Cate FJ, Shamdasani V, et al. Far-wall pseudoenhancement during contrast-enhanced ultrasound of the carotid arteries: clinical description and in vitro reproduction. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:593–600.
- [4] Thapar A, Shalboub J, Averkiou M, Mannaris C, Davies AH, Leen EL. Dose-dependent artefact in the far wall of the carotid artery at dynamic contrast-enhanced US. *Radiology* 2012;262:672–9.
- [5] O'Leary DH, Bots ML. Imaging of atherosclerosis: carotid intima-media thickness. *Eur Heart J* 2010;31:1682–9.
- [6] Shinkel AFL, Krueger CG, Tellez A, Granada JF, Reed JD, Hall A, et al. Contrast-enhanced ultrasound for imaging vasa vasorum: comparison with histopathology in a swine model of atherosclerosis. *Eur J Echocardiogr* 2010;659–64.
- [7] Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, Marrocco-Trischitta MM, Melisurgo G, Mauriello A, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries. Correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:223–30.





#### **4.4 Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus.**

Autors: **Rubinat E**, Ortega E, Traveset A, Alonso N, Betriu A, Granado-Casas, M, Hernández M, Soldevila J, Puig-Domingo M, Jurjo C, Fernández E, Mauricio D.

Publicat a *Atherosclerosis* 2015; 241:334-338.

Aquest article parteix dels resultats previs del nostre grup en pacients amb DM2, en els que el senyal de VV es va trobar augmentat en relació amb els subjectes sense DM, i a més aquest increment va ser més marcat en els pacients diabètics amb retinopatia que en aquells sense aquesta complicació.

L'objectiu va ser estudiar si el senyal de VV de la caròtida comú també es trobava incrementat en els DM1 respecte als controls sans, i a més si els pacients amb DM1 i retinopatia diabètica presentaven un senyal més intens que aquells sense retinopatia, basant-nos en la hipòtesi que mantenim que els canvis microangiopàtics que es donen en la diabetis afecten directament els VV. Per a tal finalitat, es va utilitzar el nou mètode de quantificació del senyal VV, usat també en l'article prèviament comentat en DM2.

Es va dissenyar un estudi transversal en què es van incloure 113 pacients amb DM1, 60 amb retinopatia i 53 sense, tots lliures de MCV, i un grup de control integrat per 78 subjectes sense factors de risc CV. Les variables clíniques i pròpies de l'ecografia amb i sense contrast que van ser recollides es descriuen detalladament en l'article.

El principal resultat, que confirmà part de la nostra hipòtesi, va ser que els pacients amb DM1 mostraven un major senyal de VV que els subjectes controls. Després d'ajustar per factors de risc cardiovascular, que podrien actuar com a factors de confusió, aquestes diferències es van mantenir. No obstant això, a diferència dels resultats obtinguts en l'estudi en DM2, no es va trobar associació entre el senyal de VV i la retinopatia diabètica en els DM1.

Els resultats que es desprenen d'aquest estudi suggereixen que els VV són una diana de la microangiopatia diabètica. Aquesta troballa, conjuntament amb els resultats previs obtinguts en pacients amb DM tipus 2, apunten a que existeix una microangiopatia de la paret arterial que contribuiria a que el procés ateroscleròtic de les grans artèries en la diabetis sigui més greu i accelerat.



Contents lists available at ScienceDirect

## Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)

## Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus



Esther Rubinat <sup>a, b, 1</sup>, Emilio Ortega <sup>c, 1</sup>, Alicia Traveset <sup>d</sup>, Maria V. Arcidiacono <sup>b, f</sup>,  
 Nuria Alonso <sup>e</sup>, Angels Betriu <sup>b, f</sup>, Minerva Granado-Casas <sup>b</sup>, Marta Hernández <sup>b, g</sup>,  
 Jordi Soldevila <sup>d</sup>, Manel Puig-Domingo <sup>e</sup>, Carmen Jurjo <sup>d</sup>, Elvira Fernández <sup>b, f</sup>,  
 Didac Mauricio <sup>b, e, \*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Recerca Biomedica de Lleida, University of Lleida, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>b</sup> Unitat de Detecció i Tractament de Malalties Aterotrombòtiques, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>c</sup> Department of Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi Suñer, Hospital Clinic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Ophthalmology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>e</sup> Department of Endocrinology & Nutrition, University Hospital and Health Sciences Research Institute Germans Trias Pujol, Carretera Canyet S/N, 08916 Badalona, Spain

<sup>f</sup> Department of Nephrology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

<sup>g</sup> Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2014

Received in revised form

7 April 2015

Accepted 25 May 2015

Available online 3 June 2015

#### Keywords:

Vasa vasorum

Diabetic retinopathy

Type 1 diabetes mellitus

Carotid ultrasound

Atherosclerosis

Macrovascular disease

### ABSTRACT

**Objective:** We hypothesize that in type 1 diabetes vasa vasorum (VV) are affected by microangiopathic changes. For this purpose, we assessed the status of the VV signal in patients with type 1 diabetes.

**Methods:** The VV signal at the arterial adventitia of the common carotid artery was evaluated by contrast-enhanced ultrasound imaging. The VV contrast agent signal was quantified in an plaque-free arterial segment as the ratio of the adventitial signal and that of the lumen of the artery. We studied 113 type 1 diabetic patients, 60 with and 53 without retinopathy and without known cardiovascular disease, and a group of 78 non-diabetic subjects free of cardiovascular risk factors. All study subjects underwent a clinical evaluation.

**Results:** The mean  $\pm$  standard deviation VV signal of healthy subjects was  $0.562 \pm 0.135$ . Type 1 diabetic patients showed a higher adventitial VV signal ( $0.723 \pm 0.128$ ) than non-diabetic subjects ( $P < 0.0001$ ). After adjustment for cardiovascular risk confounders, this difference remained significant. No differences in VV signal, or common carotid intima-media thickness, between subjects with and without retinopathy were found.

**Conclusions:** Type 1 diabetic patients, independently of their retinopathy status, show an increased angiogenesis of the VV of the common carotid artery compared with non-diabetic subjects. Diabetic microangiopathy, that according to our results would also affect the wall of the large arteries, could be a factor contributing to atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus is a condition associated with increased risk for cardiovascular disease [1]. Data from previous research

suggest the existence of a “common soil” for the development of diabetic micro and macroangiopathy [2]. Additionally, these two main types of angiopathy share common pathogenetic mechanisms [3–5].

The plexus of microvessels in the large artery wall is known as vasa vasorum (VV) [6]. This network of small vessels in the adventitia supply nutrients and oxygen to the walls of the large arteries. Barger et al. developed an original hypothesis on the implication of vasa vasorum neoangiogenesis in the pathogenesis of coronary artery disease [7]. Other studies described the role of

\* Corresponding author. Department of Endocrinology & Nutrition University Hospital Germans Trias Pujol, Carretera Canyet S/N, 08916 Badalona, Spain.

E-mail address: [didacmauricio@gmail.com](mailto:didacmauricio@gmail.com) (D. Mauricio).

<sup>1</sup> E. Rubinat and E. Ortega contributed equally to this study.

intimal neovascularisation originating from the adventitia in the appearance of coronary ischemic events [8,9]. Hypoxia and ischemia are the main stimuli for VV angiogenesis [6], a situation that is analogous to what occurs in diabetic retinopathy and other microangiopathic complications [10].

It has been suggested that microvascular pathology is contributing also to the development of atherosclerosis in type 1 diabetic patients [3–5]. Previous research focused mainly on the role of neovascularisation in progression and rupture of atherosclerotic plaques.

We have recently hypothesized that the microvessels of large arteries are an important target site for diabetic microangiopathy, similar to other classical target organs, e.g. the retina and the kidney glomerulus [11]. The involvement of diabetic microangiopathy in atherosclerosis in type 1 diabetes dates back to 1969, when Angervall et al. demonstrated that the vasa vasorum of the aorta of diabetic patients showed the specific changes of diabetic microvascular disease [12]. The scientific community did not pay much attention to these findings until recently.

The situation of chronic hyperglycemia in diabetes affects the microvessels of classical target organs. Additionally, recent evidence points to the fact that involvement of the microcirculation is more extensive, leading to the concept of generalized microangiopathy [3,11,13]. We suggested that hyperglycemia leads to microangiopathy of the VV that could explain the differential features of atherosclerosis in diabetes mellitus. We also hypothesized that this microangiopathy of large arteries is the substrate of the diabetic atherosclerotic process. To test this concept, in a previous study in patients with type 2 diabetes we found an increased angiogenesis of the common carotid VV which was further increased in those subjects with retinopathy [11]. This was subsequently confirmed in a larger cohort of type 2 diabetic patients [14].

Based on our previous findings in type 2 diabetes, we undertook the current study to test whether the VV signal in patients with type 1 diabetes would also be increased and that those with retinopathy would show an increased signal as compared to those without retinopathy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design, participants and clinical assessment

This was a single-centre cross-sectional study designed to assess the hypothesized differential carotid VV signal in adult patients with type 1 diabetes as compared to controls and also to assess whether there is an increased VV signal in those with retinopathy. The design and the methodology of the study was very similar to our previous study in type 2 diabetes [11].

Patients were included if they had type 1 diabetes, of adult age, normal renal function (glomerular filtration rate > 60 ml/min), and had no known cardiovascular disease. Thereafter, subgroup allocation was performed according to presence or absence of diabetic retinopathy. Among the exclusion criteria, to avoid the enrolment of patients with a different microangiopathic complication, a normal urinary albumin-to-creatinine ratio (<30 mg/g) was a requirement in patients without retinopathy. Furthermore, in subjects with retinopathy, macroalbuminuria (urine albumin-to-creatinine ratio above 299 mg/g) was an additional exclusion criterion.

We studied a specific control group for this study consisting of 78 healthy volunteers. These subjects had no history of cardiovascular disease or other risk conditions: active smoking, diabetes mellitus (normal fasting glucose), kidney disease, dyslipidemia, or hypertension.

Diabetic subjects were recruited at the outpatient clinic of

Hospital Arnau de Vilanova, the only reference centre of the region caring for adults with type 1 diabetes. Five subjects withdrew from the study after the screening visit, and 3 other were excluded because of the presence of exclusion criteria (not having type 1 diabetes, or impaired kidney function). Nine patients were excluded because conditions that precluded correct ultrasound image acquisition; we already described these conditions elsewhere [11,15]. No subjects were excluded because of a plaque in the common carotid, a condition that precluded the assessment of the main objective of the study. Finally, 113 type 1 diabetic adult patients were included. All subjects had a complete clinical evaluation (Table 1). If a patient taking medication for hypertension or dyslipidemia, he/she was considered to have previous hypertension or dyslipidemia. Standardised methods were used to determine blood pressure, weight, height and waist circumference. An experienced ophthalmologist assessed and classified retinopathy according to an international consensus on clinical diabetic retinopathy [16]. All patient clinical records were reviewed to ensure that any previously known cardiovascular disease or revascularization procedures were detected (coronary disease, cerebrovascular disease, and peripheral vascular disease, including diabetic foot episodes). Apart from the anamnestic evaluation, the cardiovascular events that occurred in the health-care area could be ascertained as access to primary care clinical records and those of other small hospital in the region was granted. Control participants were assessed for the same variables (except haemoglobin A<sub>1c</sub> and microalbuminuria).

The laboratory variables, shown in Table 1, were determined as in our previous study using standardized lab methodology [11]. All samples were obtained in the fasting state. Haemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) is expressed in NGSP/DCCT units.

### 2.2. Carotid ultrasound imaging study

The ultrasound procedures and measures were performed by one researcher (ER), who was blinded to the study group allocation. All conventional and contrast-enhanced ultrasound images were obtained with a Siemens Sequoia 512 using a 15-Mhz linear array probe with low mechanical index (0.4–1.4). The common carotid intima–media thickness (cIMT) was measured with conventional ultrasound procedures. For the purpose of the current study, the mean cIMT value of the common carotid arteries was included as the relevant variable, as this is the arterial territory where the VV signal was assessed. All the extra-cranial carotid arteries (common, bifurcation, internal, and external) were investigated for the presence of atherosclerotic plaques according to the Mannheim consensus [17]. A more detailed description of all ultrasound protocols was provided recently [11,15].

For the contrast-enhanced ultrasound imaging procedure the ultrasound device is equipped with a cadence contrast pulse sequencing software. Immediately after the conventional ultrasound procedure, exploration of the common carotid VV signal was performed using Sonovue (Bracco Spa, Italy) as the contrast agent. A vial of this product was solubilized in 5 ml of saline; a bolus of 2.5 ml was injected for each artery explored. All the images are stored for subsequent measurement using the Syngo software (Siemens, Germany). The quantitative measurement of the adventitial VV signal was previously developed by our group, based on the principle of normalizing the VV to lumen contrast intensity [11]. Briefly, the signal of common carotid wall VV is calculated as the ratio of the signal intensity in the 2 mm above the intima–lumen boundary and the intensity of the 2 mm below the media–adventitia boundary (Supplementary Figure 1). The intensity of this signal was measured on the far wall of the common carotid artery. The final value is the average of 10–20 diastolic frames of the 1-min DICOM video of the image acquisition process. Also, a

**Table 1**  
Clinical characteristics of the different study groups.

	Control (n = 78)	Diabetes without retinopathy (n = 53)	Diabetes with retinopathy (n = 60)	P value for group differences	P value for retinopathy vs. no retinopathy
Sex (male/female)	42/36	23/30	33/27	0.4207	0.2183
Age (yr)	48 (40–57)	46 (39–51)	48 (42–53.5)	0.4212	0.2381
Disease duration (yr)	–	14 (10–18)	27.5 (20–33.5)	–	<0.0001
Smoking (current/past/never)	0/2/76	18/16/19	9/21/30	<0.0001	0.0569
Dyslipidemia (yes/no)	0/64	22/31	28/32	<0.0001	0.5818
Hypertension (yes/no)	0/64	9/44	24/36	<0.0001	0.0072
Systolic BP (mm Hg)	123 (113–135)	121 (113–133)	131 (118–145)	0.0337	0.0251
Diastolic BP (mm Hg)	75 (69–81)	75 (69–80)	74 (67.5–80)	0.6027	0.3973
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.5 (22.3–26.4)	24.9 (22.5–27.7)	25.8 (23.2–29)	0.1127	0.3444
Waist circumference (cm)	88 (82–98)	89 (81–96)	88.5 (78–100)	0.9880	0.9977
Hemoglobin A <sub>1c</sub> (mmol/mol)	NA	56.5 (52–62)	60.5 (54–68.5)	–	0.0224
Total cholesterol (mmol/l)	184 (164–202)	182.5 (164–202.5)	189.5 (168–209)	0.5366	0.4428
HDL-cholesterol (mmol/l)	53.0 (45–63)	60 (53–72)	62 (54–80)	<0.0001	0.3771
LDL-cholesterol (mmol/l)	116 (98–131)	102.7 (89.4–117.1)	105.4 (86–123.4)	0.0359	0.9953
Triglycerides (mmol/l)	63 (50–87)	65.5 (54.5–85.5)	64.5 (53–91)	0.6559	0.8659
Serum creatinine (μmol/l)	0.87 (0.72–0.99)	0.79 (0.68–0.94)	0.78 (0.66–0.90)	0.0220	0.3789
Urinary albumin:creatinine ratio, mg/g	NA	4.2 (3.2–6.1)	5.2 (3.6–9.8)	–	0.1665

Data are presented as median (25th and 75th percentiles) or absolute numbers. BP: blood pressure. P = 0.0264 for comparison of active smokers between patients with and without retinopathy.

qualitative assessment of the presence of contrast in the plaques was also carried out (presence or absence).

The protocol was approved by the local Ethics Committee, and all subjects signed a written informed consent form.

### 2.3. Sample size calculation

Based on our previous results in type 2 diabetes [11], we calculated a sample size of the 3 study groups that would allow a 80% power to detect a difference between patients with and without retinopathy (minimum difference between groups of 0.079, with a standard deviation of the mean VV signal of 0.135), and also to assess the difference between controls and type 1 diabetic patients (minimum difference of 0.096, with a standard deviation of the mean of 0.140). A minimum number of 46 patients per group were necessary.

### 2.4. Statistical analysis

Data are given as median and 25th and 75th percentiles, mean ± standard deviation (SD), and n (%). The chi-squared test was used to assess the differences categorical variables between the 2 diabetic and the 3 study groups in clinical and laboratory variables. Wilcoxon or Kruskal–Wallis tests were used for continuous non-normally distributed variables, and the student's t-test or one-way ANOVA for continuous normally distributed variables. The associations between variables of interest and the VV signal were also investigated. VV signal differences by gender or in subjects with vs. without hypertension, dyslipidemia, or smoking habit

were evaluated with the unpaired Student's t-test. We used the Spearman's correlation analysis to measure the cross-sectional relationships between continuous variables and the VV signal. Unadjusted and adjusted general linear models tested whether the VV signal or the cIMT values differed by group (between the 3 study groups), and between the 2 groups of diabetic patients. Differences in the frequency of plaques between groups were studied using univariate or multiple logistic regression models. A significance level of  $P \leq 0.05$  was defined. The SAS software, v. 9.2 (SAS Institute Inc., USA) was used for all analyses.

## 3. Results

The clinical characteristics of the study groups are shown in Table 1. There was no difference in the sex distribution between groups. All patients classified as having dyslipidemia were treated with statins. As in other studies comparing diabetic patients with and without retinopathy, there were differences in terms of cardiovascular risk factors and disease duration due to the selection criteria, the metabolic condition or disease stage of diabetic patients. Furthermore, compared with those without retinopathy, subjects with retinopathy had a higher frequency of hypertension, and values of systolic blood pressure and HbA<sub>1c</sub> (Table 1).

The results of the carotid ultrasound imaging studies are shown in Table 2. First, we investigated the potential association between the any study variables and the VV signal. In non-diabetic subjects, there was no association between the VV signal and any of the other variables. Interestingly, in subjects with type 1 diabetes, there was an association of the VV signal and other variables, i.e.

**Table 2**  
Ultrasonographic carotid study variables: carotid intima – media thickness, vasa vasorum signal and frequency of carotid plaques.

	Control (n = 78)	No retinopathy (n = 53)	Retinopathy (n = 60)	<sup>a</sup> P value for group differences	<sup>b</sup> P value for retinopathy vs. no retinopathy
VV signal <sup>c</sup>	0.562 (0.135)	0.708 (0.122)	0.736 (0.132)	<0.0001	0.1803
Mean common carotid cIMT (mm) <sup>c</sup>	0.67 (0.13)	0.69 (0.12)	0.69 (0.15)	0.4776	0.3755
Frequency of plaques <sup>c</sup>	10 (12.8)	18 (34)	26 (43.3)	0.0002	0.4780

Adjusted P values are shown.

<sup>a</sup> As control subjects did not have cardiovascular risk factors by design, P values were adjusted for age and sex.

<sup>b</sup> The variables included in the models for diabetic group comparisons were as follows: age and sex for VV signal; sex, age, smoking, dyslipidemia, hypertension, and systolic blood pressure for cIMT and plaque presence.

<sup>c</sup> Data presented as mean (SD) or n (%).

hypertension ( $P = 0.0300$ ), BMI ( $r = 0.21$ ;  $P = 0.0255$ ), waist circumference ( $r = 0.22$ ;  $P = 0.0204$ ), HDL cholesterol ( $r = -0.20$ ;  $P = 0.0355$ ) and HbA1c ( $r = 0.30$ ;  $P = 0.0014$ ). It should be noted that no association was found between the duration of diabetes and the VV signal. We modeled a multiple stepwise regression including age, group and variables associated with VV mean and found that only HDL cholesterol ( $P = 0.0132$ ), hypertension ( $P = 0.0160$ ) and HbA1c ( $P = 0.0424$ ) were retained as variables associated with VV signal. Mean VV signal increased from normal to diabetic subjects without and with retinopathy ( $p < 0.0001$ ). Further, as a group, subjects with diabetes showed a higher VV signal than control participants ( $0.723 \pm 0.128$  vs.  $0.562 \pm 0.135$ ;  $P < 0.0001$ ). The difference in the VV signal between type 1 diabetic patients with and those without retinopathy was not significant both before ( $P = 0.2689$ ) and after ( $P = 0.1803$ ) adjustment for sex and age (Table 2).

Concerning the conventional ultrasound measures, no association was found between cIMT and VV signal intensity. Also, the cIMT value in diabetic patients with retinopathy compared with those without retinopathy was not different (Table 2). The adjustment for common cardiovascular risk factors did not change these results.

Finally, the frequency of carotid plaques was different between groups ( $P < 0.0001$  for group differences), with no difference between the 2 groups of type 1 diabetic subjects ( $P = 0.4780$ ). These results did not differ after adjusting for cardiovascular risk confounders (Table 2). Additionally, in diabetic subjects no association was found between the VV signal in the common carotid artery wall and the frequency of carotid plaques in other carotid territories. Among diabetic patients with carotid plaques, 3 out of 26 patients with retinopathy and 4 out of 18 patients without retinopathy had intraplaque neovascularisation (NS).

#### 4. Discussion

This is the first description of an enhanced VV signal in type 1 diabetic patients, measured by contrast-enhanced ultrasound imaging, as a sign of increased adventitial angiogenesis in a plaque-free segment of the wall of the carotid artery. However, although we also hypothesized that the degree of VV microangiopathy would be associated with retinopathy, we could not show differences between diabetic study groups, according to retinopathy status. Even after adjustment for potential cardiovascular risk confounders, this increased VV signal in type 1 diabetes was highly significant. The current results support the hypothesis that microangiopathy of the adventitial vasa vasorum may be a relevant diabetic complication. Even those diabetic subjects without retinopathy showed an increased VV signal. Our findings confirm those obtained in a very old post-mortem study of the aorta in type 1 diabetic subjects that showed the typical characteristics of diabetic microangiopathy of the VV of this large vessel [12]. Unfortunately, these seminal findings had no impact on later research into the specific field of diabetic atherosclerosis. Although the results of our study give only indirect evidence, we strongly believe that current findings should encourage new research in the direction of microangiopathy of large artery walls as an additional causal mechanism of the atherosclerotic process induced by hyperglycemia.

After the first description of the microvascular pathology in wall of the aorta of young diabetic patients several decades ago [12], this is the first description of the adventitial VV status of a large artery in type 1 diabetic patients without clinical cardiovascular disease. Actually, our findings are concordant with 2 previous studies in type 2 diabetic subjects that have established the presence of an increased adventitial VV signal using a contrast-enhanced ultrasound procedure [11,14]. Feinstein et al. were the first to use this

approach in ultrasound imaging to investigate the role of large artery microvessel disease as a substrate in the development of atherosclerosis [18]. They showed that plaque neovascularisation and adventitial VV were associated with plaque severity and cardiovascular events [19,20]. The results found with this technique were confirmed to have a histological correlate [21,22].

Apart from an increased VV signal in type 2 diabetes, our group found an association of an increased VV signal with diabetic retinopathy [11]. However, we could not confirm this finding in the current study in type 1 diabetes. Factors like dyslipidemia, higher blood pressure and older age, that are more strongly associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes, are also considered potential angiogenic factors that contribute to the VV hyperplasia present in non-diabetic subjects with cardiovascular disease [23]; this could explain, at least in part, the discordant results found in the two types of diabetes. It is also possible that a larger sample size is necessary to demonstrate the association of large artery wall microangiopathy and diabetic retinopathy in type 1 diabetes.

After considering all available data and the suggested role of vessel wall microcirculation in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes [2–5,12], we propose that diabetic microangiopathy of the large artery wall microvessels is an important substrate for specific diabetic atherosclerotic disease. As previously hypothesized [11], we think that there is a response of the artery wall microcirculation to ischemia/hypoxia; these are the stimuli that also drive microvascular changes in other target organs of diabetic microangiopathy like the retina [10].

There were no differences in cIMT values between the study groups. However, the present study was not designed to test this potential difference and this prevents us from drawing any conclusion concerning the measures of preclinical atherosclerosis (cIMT and frequency of plaques). Additionally, we should point out that there was a lack of correlation between cIMT and the VV signal in the current as well as in previous studies in type 2 diabetes [11,14]. Also, as in type 2 diabetes, no correlation was found between the presence of atherosclerotic plaques in other carotid segments and the common carotid VV signal. In line with our previous findings and those of others in type 2 diabetes [11,14], the increased angiogenic signal detected in the common carotid wall may be an early event in the development of characteristic macroangiopathic changes of diabetes mellitus. Thus, the current work points to the fact that the increased angiogenic signal in individuals with diabetes mellitus may represent an early event that precedes the appearance of atherosclerotic lesions, as pointed out by other investigators [5,23]. We and others have already suggested that these initial structural microangiopathic changes could mediate the metabolic memory of the target organ i.e. the arterial wall [5,11]. This may have relevant clinical implications as it has been shown that early intervention in the course of the disease can prevent cardiovascular disease burden in type 1 diabetes [24].

The present study carries some limitations. First, the inclusion of control participants without known cardiovascular risk factors does not allow the assessment of the influence of other factors on the VV signal in subjects without diabetes. For instance, it should be pointed out that the increased VV signal in type 1 diabetic subjects could be the result of hyperemic changes induced by hyperglycemia itself. To address this question, it would be necessary to explore this signal in the diabetic subjects before and after normalization of hyperglycemia. Also, the cross-sectional design does not allow to take any conclusion as to the exact role of microangiopathy of the wall of large arteries in the development of atherosclerosis in type 1 diabetes. Further, the VV signal intensity has not been tested as an early sign of future development of atherosclerotic lesions or as predictor of future cardiovascular disease in diabetic subjects. Therefore, the findings should be tested in future longitudinal

investigations, especially in type 1 diabetic patients who are often free of any additional risk factors for atherosclerosis.

It is also important to point out we used a method to evaluate the adventitial VV that was previously developed following strict methodological conditions to evaluate the contrast signal [11,17]. This method has also been used by other researchers with long experience in contrast-enhanced ultrasound vascular in larger studies where they have confirmed our previous findings in type 2 diabetes [14]. Nevertheless, some authors have described the presence of artifacts produced by pseudo-enhancement during contrast-enhanced ultrasound procedures [25]. However, we have already reported that the procedure established by our research group is not affected by these artifact images in the far wall of the carotid arteries (Supplementary Figure 1). In a previous publication, these methodological issues were extensively discussed [14].

In conclusion, we have shown in the common carotid artery of type 1 diabetic patients without previous clinical cardiovascular disease an increased angiogenic signal. This suggests that the wall of large arteries is a target organ of diabetic microangiopathy in diabetes. However, we could not demonstrate an even more strong signal of increased angiogenesis in type 1 diabetic patients with retinopathy. Together with previous findings in type 2 diabetes [11], evidence from this study reinforces the concept that large arteries may be a target site for diabetic microangiopathic complications. This could explain the fact that chronic hyperglycemia leads to a more severe and rapidly evolving atherosclerotic process in diabetes mellitus. The current findings deserve further investigation as they support the existence of a more generalized microangiopathy, including adventitial neovascularization in large arteries as an early manifestation of diabetic macroangiopathy.

### Conflict of interest

All authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

### Acknowledgements

We are grateful to the colleagues of the departments for contributing to the inclusion of study subjects. We also thank all the staff of UDETMA who supported the study and the local biobanking facility (RETICS RD09/0076/00059).

This project was funded by grant No. PS09/01035 and No. PI12/00183, both included in Plan Nacional de I+D+I and co-financed by Instituto de Salud Carlos III – Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The funding source had no role in the study design and conduct, analysis and interpretation of the data, writing or decision to submit the article.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.024>.

### References

- [1] C. Stettler, S. Allemann, P. Juni, C.A. Cull, R. Holman, M. Egger, et al., Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: meta-

- analysis of randomized trials, *Am. Heart J.* 152 (2006) 27–38.
- [2] M. Brownlee, The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes* 54 (2005) 1615–1625.
- [3] G.E. McVeigh, W. Gibson, P.K. Hamilton, Cardiovascular risk in the young type 1 diabetes population with a low 10-year, but high lifetime risk of cardiovascular disease, *Diabetes Obes. Metab.* 15 (2013) 198–203.
- [4] G. Orasanu, J. Plutzky, The pathologic continuum of diabetic vascular disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 53 (2009) S35–S42.
- [5] T.W. Jax, Metabolic memory: a vascular perspective, *Cardiovasc. Diabetol.* 9 (2010) 51.
- [6] A.C. Langheinrich, M. Kampschulte, T. Buch, R.M. Bohle, Vasa vasorum and atherosclerosis – quid novi? *Thromb. Haemost.* 97 (2007) 873–879.
- [7] A.C. Barger, R. Beeuwkes III, L.I. Laine, K.J. Silverman, Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis, *New. Engl. J. Med.* 310 (1984) 175–177.
- [8] A.C. Barger, R. Beeuwkes 3rd, Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.* 66 (1990) 41G–43G.
- [9] M. Kumamoto, Nakashima, K. Sueishi, Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance, *Hum. Pathol.* 26 (1995) 450–456.
- [10] N. Cheung, P. Mitchell, T.Y. Wong, Diabetic retinopathy, *Lancet* 376 (2010) 124–136.
- [11] M.V. Arcidiacono, A. Traveset, E. Rubinat, E. Ortega, A. Betriu, M. Hernández, et al., Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus, *Atherosclerosis* 228 (2013) 142–147.
- [12] L. Angervall, I. Dahl, J. Säve-Söderbergh, The aortic vasa vasorum in juvenile diabetes, *Pathol. Microbiol.* 29 (1966) 431–437.
- [13] J. Woerdeman, E. van Duikerken, M.P. Wattjes, F. Barkhof, F.J. Snoek, A.C. Moll, et al., Proliferative retinopathy in type 1 diabetes is associated with cerebral microbleeds, which is part of generalized microangiopathy, *Diabetes Care* 37 (2014) 1165–1168.
- [14] U.K. Sampson, F.E. Harrell, S. Fazio, S. Nwosu, N. Mercaldo, G.A. Mensah, et al., Carotid adventitial vasa vasorum and intima-media thickness in a primary prevention population, *Echocardiography* 32 (2015) 264–270, <http://dx.doi.org/10.1111/echo.12646>.
- [15] M.V. Arcidiacono, E. Rubinat, E. Ortega, A. Betriu, E. Fernández, D. Mauricio, Pseudo-enhancement does not explain the increased carotid adventitial vasa vasorum signal in diabetic patients, *Atherosclerosis* 229 (2013) 459–461.
- [16] C.P. Wilkinson, F.L. Ferris 3rd, R.E. Klein, P.P. Lee, C.D. Agraddh, M. Davis, et al., Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales, *Ophthalmology* 110 (2003) 1677–1682.
- [17] P.J. Touboul, M.G. Hennerici, S. Meairs, H. Adams, P. Amarenco, N. Bornstein, Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006), *Cerebrovasc. Dis.* 23 (2007) 75–80.
- [18] S.B. Feinstein, Contrast ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum and atherosclerotic plaque neovascularization, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 236–243.
- [19] D. Staub, M.B. Patel, A. Tibrewala, D. Ludden, M. Johnson, P. Espinosa, et al., Vasa vasorum and plaque neovascularization on contrast-enhanced carotid ultrasound imaging correlates with cardiovascular disease and past cardiovascular events, *Stroke* 41 (2010) 41–47.
- [20] D. Staub, S. Parlovi, A.F.L. Schinkel, B. Coll, H. Uthoff, M. Aschwanden, et al., Correlation of carotid artery atherosclerotic lesion echogenicity and severity at standard US with intraplaque neovascularization detected at contrast-enhanced US, *Radiology* 258 (2011) 618–626.
- [21] S. Coli, M. Magnoni, G. Sangiorgi, M.M. Marrocco-Trischitta, G. Melisurgo, A. Mauriello, et al., Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries. Correlation with histology and plaque echogenicity, *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 223–230.
- [22] M.F. Giannoni, E. Vicenzini, Citone, M.C. Ricciardi, L. Irace, A. Laurito, et al., Contrast carotid ultrasound for the detection of unstable plaques with neoangiogenesis: a pilot study, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 37 (2009) 722–727.
- [23] M.T. Malecki, G. Osmenda, M. Walus-Miarka, K. Ciganek, B. Mirkiewicz-Sieradzka, T.A. Damek-Guzik, et al., Retinopathy in type 2 diabetes mellitus is associated with increased intima-media thickness and endothelial dysfunction, *Eur. J. Clin. Invest* 38 (2008) 925–930.
- [24] J.M. Lachin, T.J. Orchard, Nathan, for the DCCT/EDIC Research Group, Update on cardiovascular outcomes at 30 years of the diabetes control and complications trial/edpidemiology of diabetes interventions and complications study, *Diabetes Care* 37 (2014) 39–43.
- [25] S.C. Van der Oord, G. Renaud, J.G. Bosch, de Jong, A.F.W. van der Steen, A.F. Schinkel, Far wall pseudo-enhancement: a neglected artifact in carotid contrast-enhanced ultrasound, *Atherosclerosis* 229 (2013) 451–452.





## 5. DISCUSSIÓ

---

La discussió dels articles que integren aquesta tesi s'ha dividit en tres blocs. Primerament s'avalua la prevalença de malaltia ateromatosa subclínica en pacients amb DM2 i la seva associació amb els factors de risc CV. A continuació, es discuteix el desenvolupament del mètode propi i original de quantificació del senyal de VV en l'adventícia de l'artèria caròtida comú, considerant l'angiogènesi dels VV com un possible marcador d'ateromatosi subclínica en població sense factors de risc CV. Finalment, s'avalua el senyal VV adventícia en pacients amb DM1, considerant la paret arterial com una diana de la microangiopatia diabètica.

### 5.1 Aterosclerosi subclínica en la diabetis mellitus tipus 2

Els valors de GIM del grup control concorden amb els valors de referència publicats en població espanyola (0.71mm en homes i 0.67mm en dones) [42], i la prevalença de placa observada en majors de 60 anys també concorda amb les dades publicades per Junyent et al. [43]. Aquestes concordances suggereixen que el grup control utilitzat en l'estudi era representatiu de la població general.

Els pacients amb DM2 presentaven un GIM incrementat i una major freqüència de plaques d'ateroma en comparació als subjectes sense diabetis. Aquest increment detectat en el GIM fou de 0.067mm, i tot i que en altres estudis s'han trobat diferències més marcades entre pacients diabètics i no diabètics [13], es tracta d'un valor similar al publicat per altres investigadors [44]. Aquestes diferències també s'han trobat en el percentatge de placa, essent un 10% superior en el grup de DM2 respecte el grup control.

En l'anàlisi multivariant el GIM s'associa a la DM2 ( $p = 0.006$ ), i tot i que també es detecta associació entre DM2 i placa (OR crua 1.63), aquesta significació es perd després d'ajustar-ho per altres variables. Aquesta pèrdua de significació es podria relacionar amb l'existència d'una alta col·linearitat entre la diabetis tipus 2 i altres factors de risc CV. L'associació entre aterosclerosi i factors de risc CV és àmpliament coneguda

[45]. En l'estudi IMPROVE, es va observar una associació positiva entre el GIM i diferents factors de risc, entre ells l'edat, el sexe, la hipertensió i el tabaquisme [46]. Aquestes dades són concordants amb els resultats del nostre estudi, excepte pel tabaquisme, variable amb què no hem trobat diferències significatives, possiblement a causa d'una grandària mostral insuficient i en la qual no es va discriminar entre no fumadors i exfumadors. Per tant, existiria la possibilitat de que la mostra en la què es va treballar inclogués un alt percentatge d'exfumadors que presentarien una lesió arterial com a conseqüència del període de temps en què van ésser fumadors actius. Indiscutiblement, existeix evidència suficient per considerar el tabaquisme com un factor de risc de primer ordre en l'aparició d'aterosclerosi [47, 48, 49].

S'han observat diferències de GIM i presència de placa entre ambdós sexes, trobant-se aquests valors augmentats en els homes respecte les dones, i a més el patró d'increment és progressiu amb l'edat. Aquestes diferències entre sexes pel que fa als valors de GIM també s'han observat en el Gutenberg-Heart Study, tot i que els resultats que se'n desprenen mostren que a major edat menors són les diferències observades, probablement per l'existència d'altres factors de confusió que són més prevalents en els rangs d'edat superiors també en la població no diabètica [50]. Cal esmentar que quan la freqüència de placa es va estratificar per edat i sexe, les diferències entre pacients diabètics i no diabètics només es mantenien significatives en el grup d'edat més jove (menors de 50 anys) [51]. En referència a l'associació detectada entre la freqüència de placa, edat i perímetre abdominal, altres troballes hi donen suport [52], encara que inclouen altres factors significatius, com la dislipèmia i la hipertensió, que tot i que en la nostra anàlisi inicialment també van mostrar una associació positiva, es va perdre després de l'ajust, possiblement a causa del propi disseny de l'estudi i de la mida mostral.

Cal assenyalar que les exploracions de l'estudi van ser dutes a terme per professionals d'infermeria i, per tant, cal remarcar el rol d'aquest col·lectiu en la prevenció i promoció de la salut. Els programes d'atenció conduïts per infermers/es a través d'un abordatge multifactorial que engloba des de l'avaluació del risc, mitjançant la realització de proves diagnòstiques, fins al seguiment i suport al llarg de tot el procés de tractament, han mostrat una reducció de la morbiditat i mortalitat en subjectes en situació d'alt risc CV [53, 54]. En pacients diabètics, s'ha demostrat que la intervenció educacional dirigida per professionals infermers millora tant el control glucèmic com de

factors de risc CV [55]. La UDETMA, marc on es va desenvolupar aquest estudi, destaca per la rellevància del rol de la infermeria. En aquesta unitat, l'equip d'infermeria s'encarrega de l'avaluació del risc CV, la detecció d'ateromatosi subclínica mitjançant la realització d'ecografia carotídia i de la consegüent implementació de mesures preventives individualitzades. A més, es responsabilitza del seguiment al llarg del procés, realitzant visites periòdiques que tenen la finalitat de millorar el compliment terapèutic i la motivació dels pacients, i duent a terme controls anuals per tal de detectar canvis en els valors de GIM i/o en la composició i morfologia de la placa d'ateroma. Aquesta implicació per part dels professionals d'infermeria juga un paper molt important en la potencial disminució del risc a través de les modificacions en els estils de vida i els canvis conductuals en diverses malalties cròniques, com l'aterosclerosi [56]. Per tant, la integració de tasques dirigides a la detecció precoç de risc CV i la intensificació de les mesures preventives és indispensable dins la pràctica clínica habitual dels professionals infermers.

Com a limitacions d'aquest estudi, cal tenir en compte que pot existir un biaix relacionat amb el fet de que la selecció dels subjectes no va ser aleatoritzada i, a més, no es disposava d'informació referent a les complicacions microvasculars (retinopatia, nefropatia, neuropatia), que es coneix que s'associen a l'augment en la prevalença d'ateromatosi subclínica [34]. Per tant, els resultats d'aquest estudi, com altres de la literatura, no són completament extrapolables a tota la població de pacients amb DM tipus 2.

## **5.2 Quantificació del senyal de vasa vasorum en població no diabètica i sense altres factors de risc cardiovascular.**

Fins a l'actualitat, la majoria dels estudis publicats en aquest àrea de recerca han estat focalitzats en la contribució dels VV en la inestabilitat de la placa d'ateroma [57]. Per tant, el nostre grup ha estat pioner en quantificar els VV en l'adventícia de la comú carotídia lliure de placa. Aquest estudi inicial es va dur a terme en pacients amb DM2, en què es va concloure que la paret arterial era una diana de la microangiopatia diabètica [34], igual que ho és la retina, el ronyó i els nervis perifèrics. La metodologia de lectura del senyal de VV ha estat desenvolupada en exclusiva pel nostre grup, i es descriu en detall en l'article dut a terme en el grup de subjectes sense factors de risc cardiovascular que forma part d'aquesta tesi.

L'estudi dels VV realitzat en aquest grup sorgeix de la necessitat de conèixer la densitat fisiològica de VV adventicis en un segment lliure de placa de la caròtida comú. La principal troballa que es desprèn d'aquest estudi és que la densitat de VV en l'adventícia comú esquerra correlaciona significativament amb les mesures de GIM en aquest mateix territori i amb l'edat, donant suport a la sensibilitat i precisió de les mesures del senyal VV adventici esquerre com un marcador precoç d'ateromatosi subclínica.

No obstant això, aquesta correlació no s'ha pogut observar en la caròtida dreta, ni tampoc considerant el rati VV i el GIM com la mitjana dels valors entre dreta i esquerra. Aquesta falta d'associació entre GIM i senyal VV quan es tenen en consideració els valors mitjans d'ambdues caròtides ja va ser descrita per Sampson et al. en pacients que presentaven ateromatosi lleu [58]. Tampoc en l'estudi en pacients amb DM tipus 2 realitzat pel nostre grup es va trobar correlació entre GIM i senyal de VV quan es feia el càlcul amb el valor mitjà dels dos costats [59]. Actualment, s'està analitzant les dades referents a la lateralitat de tots els estudis que s'han dut a terme, i que inclouen pacients amb diabetes tipus 1, tipus 2 i pacients amb malaltia renal crònica. Per tant, els resultats del nostre estudi remarquen la importància d'estudiar ambdues caròtides de forma independent també en subjectes sense ateromatosi establerta.

El fet de distingir entre ambdues caròtides en la medició dels VV adventicis es basa en les troballes de Lemne C et al. [60], que en un estudi amb subjectes normotensos va

observar valors de GIM més elevats en la caròtida esquerra. A més, l'associació entre risc cardiovascular i anatomia vascular no és uniforme per al GIM de la paret arterial [61], o per a la presència de placa [62, 63]. Cal tenir en compte que aquestes diferències anatòmiques s'atenuen amb la presència d'altres factors de risc com la hipertensió. S'ha observat que quan la pressió arterial mitjana és de 90mmHg o inferior, el GIM és més elevat en la caròtida esquerra que en la dreta, però quan és superior a 90mmHg no només s'atenua l'efecte de l'edat sobre el GIM, sinó que també s'atenuen les diferències entre el GIM d'ambdues caròtides [64]. Aquestes diferències també es van posar de manifest en l'estudi Rotterdam, en què les diferències de GIM entre subjectes majors de 55 anys amb i sense hipertensió només eren significatives en la caròtida dreta, suggerint d'aquesta manera que les lesions arterioscleròtiques es desenvolupen primerament en el costat esquerre [65]. Una explicació plausible a aquest fet seria que la caròtida esquerra s'origina directament des de l'arc aòrtic i, per tant, està exposada continuadament a un més alt impacte de l'anomenat "shear stress" [66]. Possiblement, el fet de que les lesions arterioscleròtiques s'iniciïn en la caròtida esquerra explicaria en part els nostres resultats de correlació entre senyal VV i GIM només en la caròtida esquerra.

Pel que fa als paràmetres bioquímics i antropomètrics mesurats (triglicèrids, proteïna C reactiva, pressió arterial sistòlica i diastòlica, pols, perímetre de cintura, índex de massa corporal, edat), dels que es coneix clarament la seva implicació en la malaltia ateromatosa, només l'edat correlaciona amb el rati VV adventici de caròtida esquerra. Donat que l'edat és el principal determinant en el increment de la prevalença de lesions ateromatoses en persones sense altres factors de risc, la nostra demostració de que el senyal VV de caròtida dreta no s'associa a l'edat dona suport a l'alta sensibilitat de les mesures obtingudes de densitat de VV adventicis en caròtida esquerra mitjançant ecografia amb contrast per al diagnòstic d'ateromatosi subclínica.

Tots els estudis anteriors s'han centrat en la contribució de la neovascularització (VV) en la inestabilitat de la placa d'ateroma [57], i els pocs estudis postmortem en humans que han trobat un augment dels VV en la placa són insuficients per donar suport al fet que en les fases molt inicials del procés ateroscleròtic els VV adventicis es troben augmentats, tal i com s'ha observat a nivell experimental en la hipercolesterolèmia [67].

Així doncs, els resultats que es desprenen del nostre estudi en població sana pel que fa a la correlació directa entre el rati VV d'adventícia esquerra i el GIM esquerre,

juntament amb els resultats previs del nostre grup amb pacients amb DM2 [34], donen suport als resultats experimentals en que un increment en els VV adventicis precedeix a l'augment en el GIM [67].

No obstant això, cal tenir en compte que a causa dels estrictes criteris d'inclusió establerts en aquest estudi no ha estat possible treballar amb una mostra més extensa. A més, la forta correlació detectada entre l'edat i el senyal VV adventici en caròtida esquerra en una població sense cap factor de risc CV posa de manifest la necessitat de dur a terme més estudis en aquest tipus de població però amb un poder estadístic més alt per tal d'establir els valors de referència de densitat de VV adventici per a caròtida dreta i esquerra, tant per homes com per dones, i també per als diferents intervals d'edat.

És molt important clarificar la validesa de la metodologia desenvolupada per a la quantificació del senyal VV. En aquest punt, cal tenir en compte que tant els resultats que es varen despendre del nostre estudi inicial en pacients amb DM2 com el mètode emprat van ser analitzats i comentats per Van der Oord et al. [68], basant-se en dos articles [69,70] que feien referència a la possible existència d'un artefacte en la paret arterial ja present en mode B (ecografia convencional sense contrast) que s'intensificaria en el mode contrast i que per tant conduiria a sobreestimar el senyal VV. Per tant, és important mencionar que en els nostres estudis es van excloure subjectes durant l'adquisició d'imatges i també durant la posterior lectura de les mateixes; els possibles motius de l'exclusió van ser els següents: 1) el senyal de fons era alt, impeding un flux d'imatge homogeni en el lumen i en l'adventícia arterial; 2) existia un augment del senyal ecogènic abans de l'administració del contrast; 3) el contrast desapareixia ràpidament, impeding una observació i gravació de qualitat; 4) existia una ombra acústica sobre l'àrea d'estudi; 5) les condicions del vas dificultaven la lectura tant amb contrast com sense; 6) només fou possible la lectura en una de les dues caròtides.

És important, també, remarcar que la lectura del senyal de VV es va fer a la paret posterior, primerament perquè és en aquesta paret on es prenen les mesures de GIM, i també per evitar confondre el senyal de VV amb altres senyals inespecífics (artefactes), presents en la paret anterior en aquest cas sí quan s'utilitza el nostre mètode.

Un altre dels punts que senyalà Van der Oord et al. sobre els resultats observats en els DM2 amb retinopatia és el fet que l'augment en la intensitat del senyal VV en aquests

subjectes respecte als que no presenten retinopatia pot ser causada per l'artefacte produït per una possible acumulació dels productes finals resultants del procés de glucosilació avançada. No obstant això, no existeixen referències que donin suport a aquesta teoria, i en tot cas aquests productes finals també es trobarien presents en l'íntima i especialment en la mitja, fet que en cap cas es va observar en el nostre estudi. A més, en un estudi dut a terme en porcs [71], es va observar que l'augment del senyal de contrast de la paret durant l'ecografia amb contrast es corresponia amb un augment en la densitat i en l'extensió de la xarxa de VV de la paret arterial en els exàmens histològics. Aquests resultats observats per Schinkel et al. també han estat corroborats histològicament en humans [40]. Per tant, existeix evidència de que el senyal en l'adventícia sorgeix de la presència del contrast en els VV.

És important afegir que en els estudis en què Van der Oord et al. basa la seva crítica al nostre mètode les exploracions es duen a terme amb el mateix equip ecogràfic i el mateix software de lectura [69, 70], diferent a l'utilitzat pel nostre grup. Aquest factor és molt important, ja que la utilització d'equips ecogràfics diferents pot donar lloc a resultats i problemes metodològics diferents. A més, hi ha evidència de que les diferències existents entre ecògrafs poden ser més notables que les diferències intralectors [72]. En tot cas, la reproductibilitat entre els dos lectors del nostre grup va ser bona, mostrant un coeficient de correlació intraclasse de 0.822 (rang 0.745-0.877).

En referència a l'aparell utilitzat pel nostre grup, Accuson Sequoia 512, cal puntualitzar que permet separar el senyal del teixit del senyal de l'agent de contrast. D'aquesta manera, durant l'adquisició de les imatges és possible separar específicament entre “només teixit”, “només contrast” o “ambdós junts”; en el nostre estudi vàrem treballar exclusivament amb l'opció “només contrast” en totes les exploracions ecogràfiques amb contrast. Les imatges es van obtenir utilitzant una sonda lineal 15L8W (7mhz) amb un índex mecànic baix de 0.18. El Sequoia 512 està equipat amb una tecnologia anomenada “cadence contrast pulse sequencing (CPS)”, capaç de combinar ambdues senyals (senyal de teixit i senyal de contrast), descartant la senyal inespecífica del teixit. D'aquesta manera, es garanteix una alta sensibilitat i especificitat en la detecció exclusiva de l'agent de contrast.

Finalment, comentar que en els estudis mencionats per Van der Oord et al. [69,70] es fa referència al fet que l'augment del senyal en l'adventícia pot correspondre a un



artefacte relacionat directament amb la dosi de contrast utilitzada, encara que els propis autors reconeixen que a dosis inferiors s'observa una disminució del possible artefacte però també una disminució en la qualitat de la imatge. La dosi utilitzada en els nostres estudis ha estat de 2.5ml de contrast de microbombolles en bolus seguit de 10ml de sèrum fisiològic, per a cadascuna de les dues caròtides. Aquesta dosi ha demostrat ser suficient per obtenir resultats significatius en el senyal de VV adventici en els estudis realitzats en diferents grups, tant en DM [34] com en pacients amb malaltia renal crònica [59].

Evidentment, el fet de tractar-se d'un mètode nou comporta que no existeixin protocols estandarditzats per a l'estudi dels VV i que, per tant, sorgeixin dubtes sobre l'existència d'artefactes que puguin alterar els resultats de quantificació de la densitat dels VV en l'adventícia carotídia. No obstant això, l'estudi en pacients amb DM2, juntament amb l'estudi amb controls sans i amb DM1, resultats que s'exposen a continuació, han demostrat que el mètode dissenyat pel nostre grup és vàlid i fiable.

### **5.3 Quantificació del senyal de vasa vasorum en pacients amb diabetis mellitus tipus 1**

Des de la primera descripció feta l'any 1966 de la patologia microvascular en la paret arterial de l'aorta de pacients joves amb diabetis tipus 1 [33], el nostre estudi en DM1 ha estat la primera aportació sobre l'estat dels VV adventicis en una gran artèria (en aquest cas, la caròtida) en aquests pacients. Els resultats obtinguts en aquest estudi concorden amb els resultats previs de dos estudis en DM2 en què es detecta un augment del senyal VV adventici mitjançant l'ús de l'ecografia amb contrast [34, 58]. Feinstein et al. van ser els primers en utilitzar aquesta tècnica d'imatge en la investigació dels microvasos de les grans artèries com a substrat per al desenvolupament de l'aterosclerosi [37]. Els resultats que van obtenir en aquests estudis demostraren que la neovascularització de la placa i els VV adventicis estaven associats a la gravetat de la placa i al desenvolupament posterior d'esdeveniments CV [38, 39].

A banda d'un augment en els VV adventicis en els pacients amb DM2 el nostre grup també va trobar una associació entre l'augment en el senyal VV i la retinopatia

diabètica [34]. No obstant això, aquesta troballa no s'ha pogut confirmar en l'estudi en DM1. Aquests resultats discordants entre els dos tipus de diabetis es podrien explicar pels factors com la dislipèmia, la hipertensió i l'edat, que estan altament associats a la DM2, i són considerats també com a potencials factors angiogènics implicats en la hiperplàsia dels VV present en els subjectes sense diabetis i sense MCV [73]. És possible que la mida mostral hagi estat insuficient per poder demostrar una associació entre microangiopatia dels VV adventicis i retinopatia diabètica en els DM1, encara que es va realitzar un càlcul de la mostra a partir dels resultats de l'estudi previ en pacients amb DM tipus 2 [34].

De tota manera, el fet que inclús els pacients amb DM1 sense retinopatia mostrin un senyal VV augmentat respecte als controls suggereix que la microangiopatia dels VV de la paret arterial pot ser una complicació de la diabetis. D'aquesta manera es confirmarien els resultats que es van obtenir en l'estudi postmortem que analitzava l'aorta de pacients amb DM1 i que mostrava l'existència de característiques típiques de la microangiopatia diabètica en els VV d'aquesta artèria [33].

Considerant la literatura existent sobre el rol de la microcirculació dels vasos de la paret en la patogènesi de l'aterosclerosi en la diabetis [24, 74, 26, 31, 33], suggerim que els VV de les grans artèries esdevenen un substrat important per al desenvolupament de la malaltia ateroscleròtica en la diabetis. Tal i com el nostre grup va hipotetitzar prèviament [34], suggerim que els VV de la paret arterial es veuen afectats per la situació d'hipòxia/isquèmia. Aquesta mateixa situació és l'estímul que condueix a canvis microvasculars com en altres òrgans diana de la microangiopatia diabètica, com en el cas de la retina [30].

Tant en els estudis en DM2 [34, 58] com en aquest estudi en DM1, es va trobar una falta de correlació entre el GIM i el senyal de VV, i igual que en aquests estudis tampoc es va observar correlació entre el senyal de VV i la presència de placa (en altres segments de l'artèria caròtida). Per això, pensem que l'augment de senyal angiogènic detectat en la paret de la caròtida comú pot ser un event precoç que precediria a l'aparició de la lesió ateroscleròtica (augment del GIM i formació de placa), tal i com han assenyalat altres investigacions [31,73]. No obstant això, caldrà confirmar aquesta hipòtesi en noves investigacions.

Pensem que aquests canvis microangiopàtics inicials podrien mediar en la memòria metabòlica de l'òrgan diana (paret arterial) [31, 34]. Aquest fet és clínicament rellevant, doncs ha estat demostrat que una intervenció precoç en el curs de la malaltia disminueix la MCV en pacients amb DM1 [75].

És important mencionar les limitacions d'aquest estudi. En primer lloc, el grup control està integrat per subjectes lliures de factors de risc i, per tant, no és possible l'avaluació de la contribució d'altres factors sobre el senyal VV en subjectes sense diabetis. Per exemple, l'augment del senyal VV en els pacients amb DM1 pot ser el resultat de canvis hiperèmics induïts per la pròpia hiperglucèmia. Per tal de clarificar aquest fet seria necessari avaluar el senyal VV en els DM1 abans i després de la normalització de la situació d'hiperglucèmia.

A més, el propi disseny transversal de l'estudi no permet extreure conclusions sobre quin seria exactament el rol de la microangiopatia de la paret de les grans artèries en el desenvolupament de l'aterosclerosi en els pacients amb DM1. Així mateix, la intensitat en el senyal VV encara no ha estat confirmada com un signe precoç en el desenvolupament de futures lesions ateroscleròtiques ni tampoc com un predictor d'events CV en pacients amb diabetis. Per tant, caldria verificar els resultats que hem trobat utilitzant dissenys longitudinals, especialment en pacients amb DM1 que sovint es troben lliures de factors de risc d'aterosclerosi addicionals.

És important remarcar que el mètode emprat per a la quantificació del senyal VV adventici en la caròtida comú va ser desenvolupat pel nostre propi grup seguint una metodologia estricta [18,34]. El nostre mètode ha estat utilitzat per altres investigadors amb una dilatada experiència en l'exploració vascular mitjançant ecografia amb contrast i han confirmat els resultats que el nostre grup va trobar en l'estudi en DM2 [58].

## 6. CONCLUSIONS

---

- Els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 sense malaltia cardiovascular prèvia presenten major prevalença de malaltia ateromatosa subclínica que els subjectes sense diabetis mellitus.
- En la prevenció i promoció de la salut els professionals infermers/es tenen un rol primordial en la realització dels procediments ecogràfics, la identificació dels factors de risc cardiovasculars i l'educació per a la salut.
- El mètode de quantificació del senyal de vasa vasorum en l'artèria caròtida comú desenvolupat i estandarditzat pel nostre grup mitjançant ecografia de contrast amb microbombolles, que mesura la relació del senyal de la paret i de la llum arterial, és vàlid, fiable i reproduïble.
- Els resultats obtinguts en pacients sense factors de risc cardiovascular suggereixen que el senyal de vasa vasorum carotídi és un potencial marcador per a l'exploració i monitorització del procés ateroscleròtic.
- Els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 presenten major senyal de vasa vasorum en l'adventícia de la caròtida comú que els subjectes sense diabetis, suggerint que la paret de les grans artèries és també una diana de la microangiopatia diabètica.
- No s'ha pogut demostrar que els pacients amb diabetes mellitus tipus 1 i retinopatia diabètica presentin un senyal de vasa vasorum més elevat en relació als que no tenen aquesta complicació microangiopàtica.

## 7. FUTURES LÍNIES DE RECERCA

---

El mètode de lectura del senyal de VV és totalment novedós i ha estat desenvolupament íntegrament pel nostre grup de treball. Es tracta de la primera tècnica referenciada a la literatura que té el propòsit de quantificar els VV en l'adventícia de la paret arterial de la caròtida comú. És per aquest motiu que seria important que estudis futurs es focalitzin en estudiar la possible variabilitat entre diferents equips ecogràfics i els *softwares* de lectura que actualment hi ha disponibles pel seu ús clínic. Així mateix és fonamental avaluar la variabilitat interlectors.

Són necessaris més estudis en subjectes amb factors de risc CV que explorin en profunditat quina és la contribució específica d'increment en el rati de VV de caròtida dreta o esquerra en la progressió del procés ateromatós, el desenvolupament d'events cardiovasculars, així com en la seva potencial regressió com a resposta a les intervencions dutes a terme sobre aquests factors de risc.

Pensem que els presents resultats encoratjaran la recerca futura en la mateixa línia de treball, en la que es creu que la microangiopatia de la paret de les grans artèries és una diana addicional del procés ateroescleròtic induït per la situació d'hiperglucèmia crònica que es dona en la diabetis mellitus.

El rol infermer és essencial per a la prevenció i promoció de la salut, i també com a investigadors clínics al mateix nivell que altres professionals de la salut i les ciències biomèdiques. Aquests professionals són fonamentals tant en la identificació dels factors de risc cardiovascular, mitjançant avaluació clínica i ecografia carotídia, com en la promoció de la salut a través de programes educacionals i d'intensificació de mesures preventives. És important que aquests professionals es formin en tècniques ecogràfiques, i adoptin un paper principal en la detecció i seguiment terapèutic de pacients en alt risc cardiovascular. En aquest sentit, seria necessari dur a terme estudis focalitzats en el cost-eficàcia de programes educacionals dirigits per professionals infermers.

## 8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

1. American Diabetes Association. "National Diabetes Fact Sheet" (Online). [citat 20 abril 2015] Disponible a: [www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)
2. Standards of medical care in diabetes—2014. *Diabetes Care* 2014; 37:14-80.
3. Familial insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) epidemiology: standardization of data for the DIAMOND Project\* The WHO Multinational Project for Childhood Diabetes Group1. *Bulletin of the World Health Organization*. 1991; 69:767-777.
4. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009; 373(9680):2027-33.
5. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 millions participants. *Lancet*. 2011; 378:31-40.
6. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87:4-14
7. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012; 55:88-93.
8. Crespo C, Brosa M, Soria-Juan A, López-Alba A, López-Martínez N, Soria B. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SECCAID: Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes). *Av Diabetol*. 2013; 29:182-189.
9. Global status report on noncommunicable disease 2010. Geneva, World health Organization, 2011. [citat 4 maig 2015] Disponible a: [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report\\_full\\_en.pdf](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf)
10. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002; 287:2570-81.

11. Beaglehole R, Bonita R. Global public health: a scorecard. *Lancet*. 2008; 372:1988–96.
12. Sun YP, Cai YY, Li HM, Deng SM, Leng RX, Pan HF. Increased carotid intima-media thickness (CIMT) levels in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM): A meta-analysis. *J Diabetes Complications* [internet]. 2015. [citad 4 maig 2015] Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.03.018>
13. Brohall G, Odén A, Fagerberg B. Carotid artery intima-media thickness in patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med*. 2006; 23:609-16
14. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*. 2003; 24:1601-10.
15. Bots ML. Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies. *Curr Med Res Opin*. 2006; 22:2181-90.
16. Devine PJ, Carlson DW, Taylor AJ. Clinical value of carotid intima-media thickness testing. *J Nucl Cardiol*. 2006; 13:710-8.
17. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007; 115:459-67.
18. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004 –2006). *Cerebrovasc Dis*. 2007; 23:75–80.
19. de Bray JM, Baud JM, Delanoy P, Camuzat JP, Dehans V, Descamp-Le Chevoir J, et al. Reproducibility in ultrasonic characterization of carotid plaques. *Cerebrovasc Dis*. 1998; 8:273-7.
20. Urbina EM, Srinivasan SR, Tang R, Bond MG, Kieltyka L, Berenson GS. Impact of multiple coronary risk factors on the intima-media thickness of different segments of carotid artery in healthy young adults (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol*. 2002; 90:953–8.

21. Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Chen W, et al. Increased subclinical atherosclerosis in young adults with metabolic syndrome: the Bogalusa Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:457–63.
22. Rubinat E, Marsal JR, Vidal T, Cebrian C, Falguera M, Vilanova MB, Betriu À, Fernández E, Franch J, Mauricio D. Subclinical Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cardiovasc Nurs* [internet]. 2015. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25829137>
23. Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi?. *Thromb Haemost*. 2007; 97:873-9.
24. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54:1615-25.
25. Hayden MR, Tyagi SC. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. *Cardiovasc Diabetol*. 2004; 3:1.
26. Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53:S35-42.
27. Barger AC, Beeuwkes R 3rd, Lainey LI, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *New Engl J Med* 1984; 310:175-7.
28. Barger AC, Beeuwkes R 3rd. Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1990; 66:41G-3G.
29. Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol*. 1995; 26:450-6.
30. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010; 376:124-36.
31. Jax TW. Metabolic memory: a vascular perspective. *Cardiovasc Diabetol*. 2010; 9:51.
32. Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44:2293-300.
33. Angervall L, Dahl I, Säve-Söderbergh J. The aortic vasa vasorum in juvenil diabetes. *Pathol Microbiol*. 1966; 29:431-7.



34. Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, Ortega E, Betriu A, Hernández M, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013; 228:142-7.
35. Adam D, Soqulin A, Coll B, et al. Quantitative contrast-enhanced ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum: calibration and initial results. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51:A318 [abstract]
36. Arcidiacono MV, Rubinat E, Borrás M, Betriu A, Trujillano J, Vidal T, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors. *Cardiovasc Ultrasound*. 2015; 13:20.
37. Feinstein SB. Contrast ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum and atherosclerotic plaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 236-43.
38. Staub D, Patel MB, Tibrewala A, Ludden D, Johnson M, Espinosa P, et al. Vasa vasorum and plaque neovascularization on contrast-enhanced carotid ultrasound imaging correlates with cardiovascular disease and past cardiovascular events. *Stroke*. 2010; 41:41-7.
39. Staub D, Parlovi S, Schinkel AFL, Coll B, Uthoff H, Aschwanden M, et al. Correlation of carotid artery atherosclerotic lesion echogenicity and severity at standard US with intraplaque neovascularization detected at contrast-enhanced US. *Radiology*. 2011; 258: 618-26.
40. Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, Marrocco-Trischitta MM, Melisurgo G, Mauriello A, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries. Correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52:223-30.
41. Giannoni MF, Vicenzini E, Citone, Ricciardi MC, Irace L, Laurito A, et al. Contrast carotid ultrasound for the detection of unstable plaques with neoangiogenesis: a pilot study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009; 37:722-7.
42. Grau M, Subirana I, Agis D, Ramos R, Basagaña X, Martí R, et al. Carotid intima-media thickness in the Spanish population: reference ranges and association with cardiovascular risk factors. *Rev Esp Cardiol*. 2012; 65:1086-93.
43. Junyent M, Gilabert R, Núñez I, Corbella E, Vela M, Zambón D, et al. Carotid ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis: distribution of intima-

- media thickness values and plaque frequency in a Spanish community cohort. *Med Clin (Barc)*. 2005; 125:770-74.
44. Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Rodríguez-Sánchez E, Patino-Alonso MC, Magallón-Botaya R, Martínez-Vizcaino V, et al. Carotid intima-media thickness in diabetics and hypertensive patients. *Rev Esp Cardiol*. 2011; 64:622-625.
45. Bierman EL. George Lyman Duff memorial lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12:647-56.
46. Baldassarre D, Nyssönen K, Rauramaa R, de Faire U, Hamsten A, Smit AJ, et al. Cross-sectional analysis of baseline data to identify the major determinants of carotid intima-media thickness in a European population: the IMPROVE study. *Eur Heart J*. 2010; 31:614-22.
47. Huxley RR, Yatsuya H, Lutsey PL, Woodward M, Alonso A, Folsom AR. Impact of age at smoking initiation, dosage, and time since quitting on cardiovascular disease in African Americans and whites: the atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol*. 2012; 175:816-26.
48. Michael Pittilo R. Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Int J Exp Pathol*. 2000; 81:219-230.
49. Sanada S, Nishida M, Ishii K, Moriyama T, Komuro I, Yamauchi-Takahara K. Smoking promotes subclinical atherosclerosis in apparently healthy men: 2-year ultrasonographic follow-up. *Circ J*. 2012; 76:2884-91.
50. Sinning C, Wild PS, Echevarria FM, Wilde S, Schnabel R, Lubos E, et al. Sex differences in early carotid atherosclerosis (from the community-based Gutenberg-Heart Study). *Am J Cardiol*. 2011; 107:1841-7.
51. Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010; 375:2215-22
52. Fujihara K, Suzuki H, Sato A, Kodama S, Heianza Y, Saito K, et al. Carotid artery plaque and LDL-to-HDL cholesterol ratio predict atherosclerotic status in coronary arteries in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2013; 20(5):452-64.

53. Haskell WL. Cardiovascular disease prevention and lifestyle interventions: effectiveness and efficacy. *J Cardiovasc Nurs*. 2003; 18(4):245-55.
54. Riccio C, Sommaruga M, Vaghi P, Cassella A, Celardos S, Cocco E, et al. Nursing role in cardiac prevention. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2004; 62(2):105-13.
55. Tshiananga JK, Kocher S, Weber C, Erny-Albrecht K, Berndt K, Neeser K. The effect of nurseled diabetes self-management education on glycosylated hemoglobin and cardiovascular risk factors: a meta-analysis. *Diabetes Educ*. 2012; 38(1):108-23.
56. Sol BG, van der Bijl JJ, Banga JD, Visseren FL. Vascular risk management through nurse-led self-management programs. *J Vasc Nurs*. 2005; 23(1):20-24.
57. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003; 349(24):2316–25.
58. Sampson UK, Harrell FE Jr, Fazio S, Nwosu S, Mercaldo N, Mensah GA, et al. Carotid Adventitial Vasa Vasorum and Intima-Media Thickness in a Primary Prevention Population. *Echocardiography*. 2015; 32(2):264-70.
59. Borràs M, Arcidiacono MV, Vilar A, Martín M, Belart M, Craver L, Fernández E. La enfermedad renal crónica estimula la neovascularización de la adventicia carotídea. *Nefrologia*. 2013; 33 (Supl.2):26.
60. Lemne C, Jogestrand T, de Faire U. Carotid intima-media thickness and plaque in borderline hypertension. *Stroke*. 1995; 26(1):34–9.
61. Polak JF, Person SD, Wei GS, Godreau A, Jacobs Jr DR, Harrington A, et al. Segment-specific associations of carotid intima-media thickness with cardiovascular risk factors: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Stroke*. 2010; 41(1):9–15.
62. Rubba P, Panico S, Bond MG, Covetti G, Celentano E, Iannuzzi A, et al. Site-specific atherosclerotic plaques in the carotid arteries of middle-aged women from southern Italy: associations with traditional risk factors and oxidation markers. *Stroke*. 2001; 32(9):1953–9.
63. Tell GS, Howard G, McKinney WM. Risk factors for site specific extracranial carotid artery plaque distribution as measured by B-mode ultrasound. *J Clin Epidemiol*. 1989; 42(6):551–9.

64. Chaubey S, Nitsch D, Altmann D, Ebrahim S. Differing effect of modifiable cardiovascular risk factors on intima-media thickening and plaque formation at different sites of the arterial vasculature. *Heart*. 2010; 96:1579–85.
65. Bots ML, Hofman A, de Bruyn AM, de Jong PT, Grobbee DE. Isolated systolic hypertension and vessel wall thickness of the carotid artery. The Rotterdam Elderly Study. *Arterioscler Thromb*. 1993; 13:64–9.
66. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983; 53:502–14.
67. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR Jr, Richardson DM, Ritman EL, et al. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*. 2001; 51:762–6.
68. Van der Oord SC, Renaud G, Bosch JG, de Jong N, van der Steen AF, Schinkel AF. Far wall pseudo-enhancement: a neglected artifact in carotid contrast-enhanced ultrasound. *Atherosclerosis*. 2013; 229:451-2.
69. Ten Kate GL, Renaud GG, Akkus Z, van der Oord SC, Ten Cate FJ, Shamdasani V, et al. Far-wall pseudoenhancement during contrast-enhanced ultrasound of the carotid arteries: clinical description and in vitro reproduction. *Ultrasound Med Biol* 2012; 38:593-600.
70. Thapar A, Shalboub J, Averkiou M, Mannaris C, Davies AH, Leen EL. Dose-dependent artefact in the far wall of the carotid artery at dynamic contrast-enhanced US. *Radiology*. 2012; 262:672-9.
71. Shinkel AFL, Krueger CG, Tellez A, Granada JF, Reed JD, Hall A, et al. Contrast-enhanced ultrasound for imaging vasa vasorum: comparison with histopathology in a swine model of atherosclerosis. *Eur J Echocardiogr*. 2010; 11:659-64.
72. O’Leary DH, Bots ML. Imaging of atherosclerosis: carotid intima-media thickness. *Eur Heart J*. 2010; 31:1682-9.
73. Malecki MT, Osmenda G, Walus-Miarka M, Ciganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, Damek-Guzik TA, et al. Retinopathy in type 2 diabetes mellitus is associated with increased intima-media thickness and endothelial dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2008; 38:925–30.

74. McVeigh GE, Gibson W, Hamilton PK. Cardiovascular risk in the young type 1 diabetes population with a low 10-year, but high lifetime risk of cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15:198–203.
75. Lachin JM, Orchard TJ, Nathan, DCCT/EDIC Research Group. Update on cardiovascular outcomes at 30 years of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. *Diabetes Care* 2014; 37:39–43.

