

UNIVERSIDAD DE NAVARRA

Programa de Medicina aplicada y Biomedicina



ESTUDIO DE LA PLACA CAROTÍDEA VULNERABLE:
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE
METALOPROTEASAS Y LA PRESENCIA DE ACTIVIDAD
INFLAMATORIA INTRAPLACA

*Memoria presentada por David Moreno Ajona para optar al grado de
Doctor en Medicina.*

Pamplona, a 14 de enero de 2022.

D. Pablo Irimia Sieira, Consultor del Departamento de Neurología de la Clínica Universidad de Navarra y Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra,

CERTIFICA:

Que D. David Moreno Ajona ha realizado bajo mi dirección el trabajo de tesis doctoral “Estudio de la placa carotídea vulnerable: correlación entre los niveles de metaloproteasas y la presencia de actividad inflamatoria intraplaca”.

Que considera que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante Tribunal, con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Pamplona, a 14 de enero de 2022.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'PABLO IRIMIA SIEIRA', is written over a light blue rectangular stamp. The signature is cursive and somewhat stylized.

Fdo.: Pablo Irimia Sieira

D. Eduardo Martínez-Vila, Consultor del Departamento de Neurología de la Clínica Universidad de Navarra y Profesor Titular de Neurología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra,

CERTIFICA:

Que D. David Moreno Ajona ha realizado bajo mi dirección el trabajo de tesis doctoral “Estudio de la placa carotídea vulnerable: correlación entre los niveles de metaloproteasas y la presencia de actividad inflamatoria intraplaca”.

Que considera que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante Tribunal, con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Pamplona, a 14 de enero de 2022.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eduardo', written over a horizontal line.

Fdo.: Eduardo Martínez-Vila

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Durante el tiempo dedicado a la consecución de este proyecto he contado con la ayuda y la colaboración de numerosas personas, y a todas ellas quiero transmitir mi más sincero agradecimiento.

De manera especial quiero agradecer al Dr. Eduardo Martínez-Vila la oportunidad que me brindó al proponerme este trabajo, la confianza que siempre ha depositado en mí.

Al Dr. Pablo Irimia Sieira, por sus orientaciones e inestimable ayuda en el desarrollo de este trabajo, su enorme amabilidad, generosidad, y su contribución y apoyo continuo en mi carrera profesional.

A los voluntarios sanos participantes en el Estudio Riesgo Vascular Navarra y a todo su equipo investigador, quienes con su participación desinteresada nos permiten avanzar en el campo de la ciencia.

Al Dr. José Antonio Rodríguez y al equipo de enfermedades vasculares del Centro de Investigación Médica Aplicada por su imprescindible colaboración en la realización de las determinaciones analíticas del estudio.

A todos los miembros del Departamento de Neurología de la Clínica Universidad de Navarra, por su respaldo en la elaboración del trabajo.

A mi madre, porque con su esfuerzo me ha brindado las mejores oportunidades y con su ejemplo me han enseñado los valores más importantes de esta vida.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mohandas Karamchad Ghandi (1869-1948)

RESUMEN

Introducción: La estenosis carotídea es responsable de un 20% de todos los ictus isquémicos. Teniendo en cuenta que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, es posible que determinados marcadores de inflamación permitan predecir el riesgo de recurrencia de ictus, y otras complicaciones vasculares en pacientes con estenosis carotídea grave (>70%) sometidos a endarterectomía carotídea. El objetivo principal del presente estudio fue determinar si los niveles circulantes de metaloproteasas (MMPs) de matriz extracelular (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-10), el inhibidor tisular de MMPs (TIMP-1) y la cuantificación de la inflamación in vivo de la placa carotídea estudiada de forma no invasiva mediante ^{18}F -FDG-PET / CT son útiles para diferenciar entre pacientes con estenosis carotídea sintomáticas y asintomáticas, o en la predicción de eventos vasculares recurrentes en pacientes con estenosis carotídea sometidos a endarterectomía.

Pacientes y métodos: Estudio de cohorte prospectivo, longitudinal multicéntrico. Se reclutaron pacientes atendidos en la Unidad de Ictus del Hospital de Navarra y la Clínica Universidad de Navarra con edades comprendidas entre 50-80 años con diagnóstico de infarto cerebral (con déficit menor) o AIT de origen aterotrombótico por estenosis carotídea grave, y pacientes con estenosis carotídea grave asintomática, que fueron sometidos a endarterectomía carotídea. Se obtuvieron muestras de plasma y suero 2 días antes de la cirugía y se analizaron los niveles de MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, TIMP-1, HDL, LDL, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular. Se realizó un estudio ^{18}F -FDG-PET / CT para cuantificar el metabolismo de la pared vascular de ambas carótidas y otros territorios vasculares, como

reflejo de la presencia de inflamación intraplaca. Se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos con anticuerpos dirigidos frente a MMP-10, MMP-9, TIMP-1 y CD68 en la placa carotídea extraída quirúrgicamente mediante endarterectomía. Asimismo, se incluyeron en el estudio 26 controles sanos, trabajadores de la Universidad de Navarra, comparables en edad y sexo a la población de pacientes.

Resultados: Se incluyeron 31 pacientes consecutivos con estenosis carotídea sintomática (n=23) o asintomática (n=8) grave a los que se les realizó endarterectomía carotídea entre julio de 2013 y marzo de 2016. Los pacientes con estenosis carotídea presentaron niveles circulantes de MMP-1, MMP-7 y MMP-10 significativamente más elevados que los controles sanos. No se encontró ninguna correlación entre las MMPs circulantes y el grado de inflamación en la placa carotídea *in vivo* evaluado mediante ^{18}F -FDG-PET / CT. El TIMP-1 intraplaca se correlacionó moderadamente con su nivel plasmático ($r = 0,42$ $p = 0,02$) y con la captación de ^{18}F -FDG-PET / CT ($r = 0,38$ $p = 0,05$). Después de una mediana de seguimiento de 1077 días, se registraron 4 eventos cerebrovasculares, 7 eventos cardiovasculares y 11 eventos vasculares periféricos que requirieron hospitalización. El nivel de MMP-7 circulante fue capaz de predecir eventos más allá de los factores de riesgo tradicionales (HR = 1,15 $p = 0,006$). Cuando el modelo de regresión se asoció con las variables de interés, la capacidad de la ^{18}F -FDG-PET / CT para predecir eventos vasculares no fue significativa.

Conclusiones: Los hallazgos del presente estudio no apoyan el uso de ^{18}F -FDG-PET / CT o los niveles de metaloproteasas o sus inhibidores para diferenciar estenosis carotídeas sintomáticas o asintomáticas y tampoco para

establecer el riesgo de recurrencia de ictus. Nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que la MMP-7 circulante podría representar un biomarcador de eventos cardiovasculares recurrentes en pacientes con estenosis carotídea grave.

LISTADO DE ABREVIATURAS

¹⁸F-FDG-PET / CT: 18 flúor-fluoro-desoxi-glucosa, emisión combinada con tomografía computarizada.

ACAS: *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study*

ACST: *Asymptomatic Carotid Surgery Trial.*

ADAM: -disintegrina y metaloproteasa.

ADAMTS: -disintegrina y metaloproteasa con dominios de trombospondina.

AIT: accidente isquémico transitorio.

AVAC: años de vida ajustado por calidad.

CCA: arteria carótida común.

CD68: *cluster of differentiation 68.*

CSP: *Veteran Affairs Cooperative Studies Program.*

DE: desviación estándar.

EANM: Asociación Europea de Medicina Nuclear.

ECA: arteria carótida externa.

ECV: enfermedad cerebrovascular.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay.*

HDL: lipoproteínas de alta densidad.

HIC: hemorragia intracerebral.

HSA: hemorragia subaracnoidea.

ICA: arteria carótida interna.

ICSS: *International Carotid Stenting Study*.

IMC: índice de masa corporal.

LDL: lipoproteínas de baja densidad.

MMPs: metaloproteasas de matriz.

NASCET: *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*.

ECST: *European Carotid Surgery Trial*.

PCR: proteína C reactiva.

PESA: *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*.

RICORNA: Riesgo para eventos CORonarios en la población de Navarra.

RM: Resonancia magnética.

ROC: características operativas del receptor.

ROI: región de interés.

SEN: sociedad española de neurología.

SUV: valor de captación estandarizado.

TBR: *target to background ratio*.

TC: Tomografía computarizada.

TIMP: inhibidor tisular de metaloproteasas.

TNF: factor de necrosis tumoral.

VSG: velocidad de sedimentación globular.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	23
1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	24
1.1.1. Concepto	24
1.1.2. Incidencia y prevalencia	244
1.1.3. Ictus isquémico aterotrombótico	244
1.2. ATEROMATOSIS	246
1.2.1. Anatomía y fisiología arterial	27
1.2.2. Definición de ateromatosis.....	27
1.2.3. Enfermedad carotídea	29
1.2.4. Tratamiento de la ateromatosis carotídea	30
1.2.5. Las metaloproteasas de matriz	34
1.2.6. Gelatinasas y colagenasas.....	36
1.2.7. Estromelisinina y matrilisina	36
1.2.8. Inhibidores tisulares de las metaloproteasas	37
1.2.9. Moléculas de señalización y MMPs	37
1.2.10. Metaloproteasas y la aterosclerosis	38
1.2.11. Las metaloproteasas en las enfermedades cardiovasculares	38
1.3. EL VALOR DE LA PET EN EL ESTUDIO VASCULAR	41
1.3.1. Bases	41
1.3.2. Primeros estudios de PET vascular	42
1.3.3. SUV o TBR.....	42
1.3.4. Primeros estudios en humanos	43
1.3.5. FDG-PET en el estudio de hipolipemiantes.....	43
1.3.6. ¿Qué está mostrando la FDG-PET vascular?.....	44
1.3.7. PET y riesgo vascular	45
1.3.8. FDG-PET y otros marcadores de aterosclerosis	46
1.3.9. FDG-PET vascular en la actualidad.....	47
HIPÓTESIS DE TRABAJO	49
OBJETIVOS	52
PACIENTES Y MÉTODOS	54
4.1. Pacientes y controles.....	55
4.2. Métodos.....	57
4.2.1. Evaluación de biomarcadores.....	59
4.2.2. Evaluación histológica	60
4.2.3. Imagen vascular mediante PET / TC con ¹⁸ F-FDG.....	61
4.2.4. Seguimiento de los pacientes	62
4.2.5. Análisis estadístico	63
RESULTADOS	66
5.1. Estudio descriptivo de la muestra	67
5.2. Comparación del grado de inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante PET-FDG en pacientes con estenosis carotídeas sintomáticas frente a las asintomáticas.	70
.....	73
5.3. Niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de su inhibidor (TIMP-1) en pacientes con estenosis carotídea sintomática y asintomática, y controles sanos.	74

5.4. Relación entre los niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de su inhibidor (TIMP-1) y la actividad inflamatoria de la placa de ateroma estudiada mediante PET-FDG.....	75
5.6. Correlación entre la inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante PET-FDG y los niveles de metaloproteasas/inhibidor, con la presencia de nuevos eventos isquémicos tras un seguimiento de al menos 12 meses.	78
5.7 Metaloproteasas en el estudio histológico de las placas y su correlación con los niveles circulantes.....	81
5. 8. Correlación entre el valor de captación de ¹⁸ F-FDG observado en la lesión ateromatosa carotídea con la densidad de células que expresan el marcador macrofágico CD68 en la pieza quirúrgica extraída mediante endarterectomía.	86
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	104
REFERENCIAS.....	107
ANEXOS.....	117
HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE	118
HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	122

INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1.1 Concepto

La enfermedad cerebrovascular (ECV) representa la segunda causa de muerte en España, tras las enfermedades isquémicas del corazón, según los últimos datos del ministerio de sanidad previos a la pandemia por SARS-CoV-2, publicados en 2019. Esto no es un dato puntual ya que, a pesar de una tendencia descendente en la tasa de mortalidad, el ictus se ha mantenido entre las primeras causas de muerte en España desde 1981 (1).

El término ECV engloba cualquier alteración, transitoria o permanente, de una o varias áreas encefálicas, como consecuencia de un trastorno de la circulación cerebral de origen isquémico o hemorrágico (2). Se define como ictus a la ECV que se presenta de forma aguda. El ictus abarca la isquemia cerebral, la hemorragia intracerebral (HIC) y la hemorragia subaracnoidea (HSA) (3).

En líneas generales, las ECVs pueden dividirse en dos grandes grupos según su mecanismo de producción: isquémicos y hemorrágicos. Los ictus isquémicos representan entre el 80-85% de todos los ictus, mientras que el 15-20% son hemorrágicos. En pacientes con isquemia cerebral, según la duración del proceso isquémico, se puede distinguir entre el ataque isquémico transitorio (AIT) y el infarto cerebral. El AIT se define como un episodio de isquemia cerebral focal o retiniana con síntomas clínicos de duración inferior a 1 hora y sin signos de infarto agudo en neuroimagen, mientras que el infarto cerebral produce un déficit neurológico que persiste más de 1 hora, indicando la presencia de necrosis tisular (4).

1.1.2 Incidencia y prevalencia

La incidencia de ictus en España, de acuerdo con los datos del estudio IBERICTUS, es de 187,4 casos por cada 100.000 habitantes (5). La prevalencia estimada en España de ictus en el año 2006 (6) fue del 6,4% en población de 70 años o más, con diferencias significativas en función del sexo (7,3% en hombres y 5,6% en mujeres). Por tanto, cada año se producen más de 71.000 nuevos casos de ictus en España, y fallecen aproximadamente 27.000 personas a causa de la ECV, lo que supone la segunda causa de muerte en nuestro país y la primera en mujeres (7).

En los últimos años, la mortalidad por ictus descendió en todos los rangos de edad en gran medida debido a los avances en el diagnóstico y tratamiento (8). Sin embargo, dos de cada tres personas que sobreviven a un ictus presentan algún tipo de secuela que limita sus actividades requiriendo asistencia y tienen un elevado riesgo de recurrencia, en torno al 12% durante el primer año y del 5% por año en los años posterior (9). También se observa un elevado riesgo de muerte de origen vascular, de hasta el 2,1% anualmente (10). Además, la atención de los pacientes que sobreviven a un ictus tiene un enorme impacto sobre los sistemas de salud, en gran medida dependiente de la necesidad de rehabilitación (11). Por todo lo expuesto, la prevención secundaria del ictus representa una estrategia esencial para reducir la mortalidad, discapacidad y coste de la enfermedad.

1.1.3 Ictus isquémico aterotrombótico

Según la causa subyacente, se distinguen varios subtipos etiológicos de infarto cerebral: aterotrombótico, cardioembólico, lacunar, de causa inusual y de origen indeterminado. El infarto cerebral aterotrombótico es la consecuencia

clínica de la enfermedad ateromatosa que afecta a los troncos supraaórticos y/o a las grandes arterias intracraneales y representa aproximadamente un 20-25% de los ictus isquémicos en nuestro medio (12). De acuerdo con las recomendaciones del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN para el diagnóstico de ictus isquémico aterotrombótico (13) se requiere al menos uno de los siguientes criterios: (1) demostrar la existencia de oclusión o estenosis >50% en una arteria extracraneal o intracraneal de gran calibre, (2) demostrar arteriosclerosis sin estenosis hemodinámicamente significativa, pero con presencia de placas o estenosis menores del 50% en la arteria extracraneal correspondiente o en la arteria intracraneal de gran calibre (cerebral media, cerebral posterior o tronco basilar), en ausencia de otra etiología y en presencia de al menos dos factores de riesgo vascular como edad mayor de 50 años, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo o hipercolesterolemia. La prevención del ictus aterotrombótico depende en gran medida del tratamiento de los factores de riesgo modificables. Se considera que más del 90% del riesgo de ictus corresponde a factores de riesgo modificables entre los que se incluyen la hipertensión, el tabaquismo, la diabetes mellitus, la dislipemia, la obesidad, y la aterosclerosis carotídea entre otros (14).

Entre los pacientes que han sufrido un ictus aterotrombótico, la incidencia de eventos cardiovasculares (recurrencia de la ECV, cardiopatía isquémica, o enfermedad arterial periférica) es mayor que en la población general con factores de riesgo vascular (15). Así, la incidencia de muerte cardiovascular, infarto agudo de miocardio, ictus u hospitalización por eventos aterotrombóticos fue del 14,53% en pacientes con ictus aterotrombótico previo y del 5,31% en pacientes con factores de riesgo vascular (15, 16).

Por tanto, teniendo en cuenta el elevado riesgo vascular asociado al ictus aterotrombótico, la identificación de aquellos pacientes con mayor riesgo de sufrir eventos vasculares es una prioridad.

1.2. ATEROMATOSIS

1.2.1. Anatomía y fisiología arterial

En ausencia de enfermedad, las arterias cuentan con una estructura en tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la adventicia. La túnica íntima está en contacto directo con la luz arterial y está compuesta mayoritariamente por células endoteliales (17). La homeostasis arterial depende en gran medida del endotelio. La regulación de la vasodilatación a expensas de la producción de sustancias como el óxido nítrico y la prostaciclina corre a cargo de las células endoteliales. Análogamente, la producción de endotelina y angiotensina II por parte de las células endoteliales conduce a vasoconstricción. La lámina elástica interna delimita la separación entre las túnicas íntima y media. Adheridas a la parte externa de ésta, se encuentran varias capas de células de músculo liso vascular que forman parte de la túnica media. En la arteria carótida y otras arterias de gran calibre, las células musculares se disponen de forma concéntrica junto con matriz extracelular, con predominio de elastina, cuya función es soportar la energía derivada del paso de flujo de sangre pulsátil. Más allá de la lámina elástica externa se sitúa la túnica más externa, la adventicia. Esta capa tiene función de sostén con predominio de fibroblastos, mastocitos y matriz extracelular rica en colágeno y proteoglicanos (18).

1.2.2. Definición de ateromatosis

La ateromatosis es un proceso inflamatorio sistémico, crónico y progresivo. Desde principios del siglo XX la noción de que la aterosclerosis era

consecuencia de un proceso meramente mecánico de la sangre sobre los giros de las arterias evolucionó gracias a algunos experimentos en cánidos a los que la inyección de sustancias químicas, como el ácido láctico (19) o el colesterol disuelto en aceite de sésamo (20) durante meses, condujo a las lesiones vasculares características. Hoy en día se conoce más sobre la fisiopatología. El colesterol LDL (*low density lipoprotein*) es la principal lipoproteína implicada en la enfermedad ya que es el que se acumula en el endotelio vascular. La distinción con el colesterol HDL (*high density lipoprotein*) es fundamental, ya que éste último tiene como destino el hígado, no participa de forma directa en la formación de placas de ateroma y los niveles elevados de HDL se consideran un factor protector frente a la ateromatosis.

Por otra parte, la participación del sistema inmune es también crucial en la génesis de la ateromatosis (21). Diferentes células del sistema inmune, productoras de citoquinas y quimiocinas, modulan e influyen la aparición de la placa aterosclerótica y su propensión a la ruptura. La interacción entre el sistema inmune y los lípidos es bidireccional. Es decir, la dislipemia aumenta el número de monocitos circulantes, eminentemente a través de hematopoiesis extramedular, y se ha comprobado que estos mismos monocitos Ly6C^{high}/CD14⁺⁺CD16⁻ son lo que se adhieren al endotelio vascular (22). Desde este momento estas células pasan a denominarse macrófagos de placa. El sistema inmune adaptativo, concretamente las células T específicas para lipoproteínas como el colesterol LDL, agrava la ateromatosis y modula el metabolismo de las lipoproteínas (23). Los macrófagos de placa se transforman en células espumosa, o *foam cells*, en inglés, lo que parece estar inducido por el

contacto con el LDL. Estas *foam cells* expresan, entre otras proteínas, el *cluster of differentiation 68* (CD68) en su membrana celular (24).

La evolución de la enfermedad ateromatosa puede distinguirse en dos estadios que a su vez se corresponden con la composición de la placa. Así pues, se definen dos tipos de placas de ateroma: estables e inestables (25). Las placas estables se componen habitualmente de una capa fibrosa gruesa con un núcleo lipídico que ocupa menos del 50% del total de la placa (26). Por otro lado, se define como placa inestable o vulnerable, aquella con capa fibrosa fina, abundante núcleo necrótico, inflamación con macrófagos, linfocitos T, mastocitos, apoptosis de células de músculo liso vascular y hemorragia intraplaca (25, 27).

1.2.3. Enfermedad carotídea

En torno al 20% de los ictus son debidos a enfermedades que afectan a la arteria carótida (12). Específicamente, la ateromatosis de la bifurcación carotídea se considera la localización más frecuentemente de las placas de ateroma (28). No obstante, existen otras enfermedades menos frecuentes de la arteria carótida que pueden, potencialmente, conducir a ictus. Entre éstas, destacan la disección arterial y la displasia fibromuscular (29). La disección arterial, en la que un hematoma en la túnica media se rompe hacia la íntima comprometiendo la luz arterial, es una causa frecuente de ictus en pacientes jóvenes (30). El antecedente de trauma o manipulación cervical podrían apuntar a una acción directa sobre la arteria o bien un trauma causado por las apófisis transversas del *axis* (C2), de C3 o la apófisis estiloides del hueso temporal (28). La displasia fibromuscular se caracteriza por un engrosamiento fibroso de la pared arterial, más frecuentemente de la túnica media, de origen idiopático. La causa no es

bien conocida, pero no tiene un origen inflamatorio ni aterosclerótico. La displasia fibromuscular afecta con mayor frecuencia a mujeres y puede presentarse en forma de ECV o enfermedad renal isquémica por afectación de las arterias renales (31).

El riesgo de ictus por ateromatosis depende en gran medida del grado de estenosis arterial. Sin embargo, existe evidencia de que otras características de la placa también influyen en el riesgo de accidente cerebrovascular y se ha demostrado que las denominadas placas inestables o vulnerables se asocian con mayor riesgo de ictus (32). Se considera que una placa es vulnerable, cuando presenta un núcleo necrótico rico en lípidos, una capa fibrosa delgada, infiltración de células inflamatorias, neovascularización intraplaca, hemorragia intraplaca, ulceración superficial y microembolización cerebral (33, 34). La inflamación en el interior de la placa podría ser un indicador útil de la vulnerabilidad de la placa, y se ha demostrado una correlación entre el grado de inflamación y el riesgo de ictus (35). La inflamación intraplaca se puede detectar y cuantificar in vivo mediante ^{18}F -FDG-PET / CT (36).

1.2.4. Tratamiento de la ateromatosis carotídea

En la actualidad, en los pacientes con ictus isquémico de etiología aterotrombótica por estenosis carotídea, las decisiones terapéuticas de reperfusión arterial no están basadas en la identificación de placas inestables o vulnerables, sino que se considera únicamente el grado de estenosis vascular. El tratamiento puede ser únicamente farmacológico o bien quirúrgico mediante endarterectomía o *stent* carotídeo, seguido de tratamiento farmacológico (37-39).

1.2.4.1. Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico de la aterosclerosis se inicia como prevención secundaria tras la identificación de lesiones o eventos isquémicos en cualquier vasculatura. Esto incluye la utilización crónica oral de fármacos anti-plaquetarios como la aspirina o el clopidogrel y su combinación con fármacos hipolipemiantes. De estos últimos, las estatinas son, salvo contraindicación, el fármaco de elección debido a sus propiedades pleiotrópicas. Éstas incluyen propiedades anti-inflamatorias y de estabilización de las placas ateroscleróticas. El control de los factores de riesgo vascular es capital para lo que pueden ser necesarios tratamientos antihipertensivos, antidiabéticos y vitamina B en caso de hiperhomocisteinemia (40).

1.2.4.2. *Tratamiento quirúrgico*

Actualmente, el tratamiento quirúrgico se reserva para pacientes sintomáticos con estenosis moderadas (50-70%) y graves (>70%). Se consideran pacientes sintomáticos aquellos que han tenido un ictus o un accidente isquémico transitorio (AIT) de ese territorio en los 6 meses previos. Se debe optar por el tratamiento quirúrgico de pacientes asintomáticos sin contraindicación quirúrgica con una estenosis superior al 60% de la luz del vaso. El tratamiento de elección es, tradicionalmente, la endarterectomía sobre el *stenting*. No obstante, este último se puede considerar en caso de mayor riesgo quirúrgico (41). Los últimos estudios han encontrado resultados comparables de ambas intervenciones (42-46). El siguiente algoritmo resume las recomendaciones de tratamiento en función del grado de estenosis:

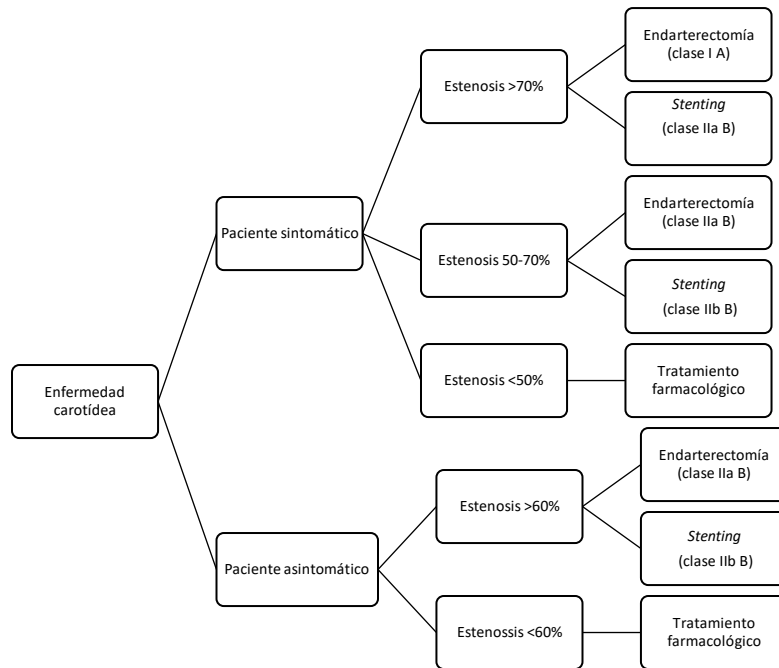


Figura 1. Algoritmo de tratamiento de la aterosclerosis carotídea.

La evidencia del algoritmo vigente radica en los resultados de los estudios *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial* (NASCET) (47), *European Carotid Surgery Trial* (ECST) (48) y el *Veteran Affairs Cooperative Studies Program Trial* (CSP) (49), que demostraron un claro beneficio de la endarterectomía carotídea en comparación el tratamiento médico en estenosis críticas sintomáticas, mayores del 70% de la luz vascular, con un beneficio más discreto en el caso de estenosis moderadas (50-70%). Un metaanálisis reciente demostró que la endarterectomía precoz en pacientes sintomáticos, dentro de las primeras 48 horas, se correspondía con una menor incidencia de ictus perioperatorio (50). También en pacientes con estenosis sintomáticas se completó el ensayo *International Carotid Stenting Study* (ICSS) con hasta 10 años de seguimiento que demostró mayor incidencia de ictus en los primeros 120 días tras el procedimiento en aquellos que se colocaron *stent* carotídeo (8,5% frente a 5,2% en el grupo endarterectomizado, HR: 1,69 p= 0,006). Si bien, la incidencia

de ictus grave, de re-estenosis, años de vida ajustado por calidad (AVAC o QALY) y coste de la intervención fueron equiparables a los 5 años (51). Un análisis posterior de los datos reveló que durante seguimiento la re-estenosis crítica ($\geq 70\%$) y el ictus ateroesceleroso ipsilateral no variaron entre grupos. No obstante, la reestenosis moderada ($\geq 50\%$) fue más frecuente en el grupo tratado mediante *stent* (42).

En el caso de las estenosis carotídeas asintomáticas, la endarterectomía está indicada en el caso de estenosis mayores del 60%, de acuerdo con los resultados de diferentes estudios como el *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study* (ACAS) y *UK Medical Research Council Asymptomatic Carotid Surgery Trial* (ACST) (43, 44). La colocación de *stent* carotídeo, en lugar de la tradicional endarterectomía demostró “no inferioridad” en un ensayo aleatorizado que comparó ambas intervenciones en pacientes con estenosis asintomáticas (52), aunque el análisis retrospectivo de más de 17000 pacientes asintomáticos, en los que se habían realizado endarterectomía o *stenting*, sugería un mayor riesgo de ictus post-intervención y muerte intrahospitalaria en aquellos en los que se optó por el *stent* (45). El recientemente publicado estudio ACST-2 ha demostrado que la morbilidad de la endarterectomía y el *stenting* carotideo en pacientes sintomáticos son comparables (46).

Sin embargo, las decisiones de tratamiento en pacientes con estenosis carotídea podrían estar basadas en la detección de placas vulnerables y no solo en el grado de estenosis. Entre los rasgos asociados a la vulnerabilidad de la placa se considera que la presencia de inflamación es uno de los más relevantes (32). La inflamación puede ser estudiada a través del estudio de niveles de mediadores

inflamatorios en sangre e intraplaca, así como técnicas de imagen que cuantifiquen la inflamación de la pared vascular (35, 36).

1.2.5. Las metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) conducen a la descomposición o lisis de proteínas de la matriz extracelular, tales como el colágeno. Los monocitos/macrófagos, además de las células endoteliales y las de músculo liso vascular pueden producir MMPs (53).

Las MMPs pertenecen a la superfamilia conocida como metzincinas. Además de las MMPs, la superfamilia de las metzincinas incluye las α -disintegrina y metaloproteasa (ADAM), y las α -disintegrina y metaloproteasa con dominios de trombospondina (ADAMTS) (54). Las funciones de esta superfamilia de enzimas van más allá de la degradación de la matriz extracelular: la regulación de la actividad de sí mismas y de otras proteasas, factores de crecimiento, quimiocinas, así como la regulación de varias fases del ciclo celular (55). Como ejemplo, la deficiencia o la acción de anticuerpos frente a una de estas proteasas, la proteasa de membrana ADAMTS13, se identificó como la causa de la púrpura trombocitopénica idiopática (56). Una reducción en la actividad de esta proteasa se ha relacionado con un incremento en la mortalidad por COVID-19 (57).

La principal diferencia entre el resto de metzincinas y las MMPs radica en la presencia, en el caso de estas últimas, de un dominio hemopexina que, en su lugar, en el caso de ADAMs es ocupado por dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (*EGF-like*), mientras que las ADAMTS, en el extremo C-

terminal contienen dominios trombospondina tipo 1 (TSP-1) (58). Hasta la fecha, se han descrito 23 proteasas dentro del grupo de las MMPs, 21 dentro del grupo de ADAMS y 19 ADAMTS en el ser humano (58). La actividad de las MMPs está determinada por el catabolismo de su grupo propeptídico que las convierte en enzimas activas, así como su inhibición. Es decir, las MMPs se sintetizan y secretan como proenzimas inactivas que poseen dicho dominio propeptídico rico en cisteínas, capaz de plegarse e interactuar con el cinc (Zn^{++}) de su dominio catalítico, lo que impide su actividad enzimática. Este mecanismo es común a las proteasas de la superfamilia de las metzincinas. La plasmina es el principal activador fisiológico (59). De forma indistinta, se utiliza el término pro-MMP o zimógeno para referirse a la MMP inactiva (58). La escisión del propéptido y por ende la activación de la MMP se produce también a través de otras MMPs o serín-proteasas. Así, por ejemplo, MMP-3 y MMP-10 pueden activar MMP-8, MMP-9 y MMP-7 con lo que la destrucción de la matriz extracelular se ve potenciada (60).

El inhibidor natural de las MMPs es el “inhibidor tisular de metaloproteasas” (TIMP). La desregulación, por exceso o por defecto en la función de las MMPs puede conducir a la aparición de enfermedades vasculares, cáncer, fibrosis pulmonar y enfermedades neurodegenerativas entre otras (61-65).

Además del dominio propeptídico rico en cisteínas mencionado previamente, ampliamente conservado entre estas proteasas, las MMPs tienen dominios estructurales que caracterizan su función. De esta manera, se clasifican como gelatinasas, colagenasas, estromelinas, matrilisinas y metaloproteasas unidas a membrana (MT-MMPs) (66). Estas últimas se asemejan a las ADAMs en que permanecen siempre unidas a la membrana celular. Por otra parte las MMPs

solubles también pueden unirse puntualmente a la membrana celular, concretamente a algunas proteínas de membrana como CD44, los proteoglicanos de heparán sulfato o al colágeno tipo IV de la membrana basal (67).

1.2.6. Gelatinasas y colagenasas

Las gelatinasas hidrolizan la gelatina a péptidos, polipéptidos y aminoácidos que, por su tamaño, pueden ser secretados por la membrana celular. Dentro de este grupo se encuentran la MMP-2 y MMP-9. Ambas MMPs se unen a gelatina y colágeno mediante dominios de su región catalítica, concretamente a través de un dominio de tres repeticiones similares a la fibronectina tipo II (*fibronectine type-II-like* en inglés) (60). El catabolismo que también producen en el colágeno explica por qué la expresión incrementada de MMP-9 se ha atribuido a la supresión del proceso de curación de heridas (68). No obstante, las enzimas que característicamente catabolizan el colágeno, las colagenasas, son MMP-1, MMP-8 y MMP-13, cuya expresión en macrófagos en regiones críticas para la integridad de las placas podría contribuir a la expansión, ruptura y hemorragia de la placa carotídea (69), además su acción en el cartílago articular se ha relacionado con la inflamación a dicho nivel (70).

1.2.7. Estromelisina y matrilisina

La familia de las estromelisininas está formada por la MMP-3, la MMP-10 y la MMP-11. Tienen actividad frente a un amplio espectro de colágenos (II, III, IV, V, IX, X y XI) y frente a tejido conectivo no colagénico que incluye fibronectina, laminina y proteoglicanos mayoritariamente (71). La MMP-7 es la única representante del grupo de las matrilisininas. Se ha comprobado la degradación por la MMP-7 de la elastina, vitronectina, fibronectina, agreganos, proteoglicanos

además del colágeno tipo II, componente principal de tejidos cartilagosos en el ser humano (72).

1.2.8. Inhibidores tisulares de las metaloproteasas

La familia de los TIMPs está formada por cuatro miembros en el ser humano: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. El dominio N-terminal de la molécula de TIMP constituye la región inhibitoria y es la que interacciona tanto con MMPs como con las ADAMs y las ADAMTS (73). No obstante, la molécula de TIMP-1 en su totalidad, incluyendo su extremo C-terminal ha demostrado una inhibición más potente de MMPs, específicamente de MMP-3 (74). En general, la inhibición de estas moléculas no es específica para una única metzincina, si bien, la unión de TIMP-2 y MMP-2 es más fuerte que otras y la actividad sobre esta MMP varía en función de la región de la molécula de MMP-2 a la que se una. Así, puede producirse la unión del dominio hemopexina del zimógeno de MMP-2 a TIMP-2 por un lado y del proMMP-2 a un activador de membrana celular por el otro (75).

1.2.9. Moléculas de señalización y MMPs

Diferentes moléculas de señalización celular y de vías metabólicas regulan la producción de MMPs lo que explica su importancia en enfermedades muy diversas. Con respecto a la inflamación, la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF) conduce al aumento en la síntesis de las colagenasas MMP-1 y MMP-3 (76). En un contexto infeccioso, como la enfermedad pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la hipoxia se ha observado como un inductor de la producción de MMP-1 (77). Factores de transcripción como el factor nuclear kB (NF-kB) potencian la secreción de MMP-1, MMP-3 por parte de macrófagos y la transcripción de MMP-9 entre otras (78, 79). La integrina-1, la integrina-2 y

la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) conducen a un aumento en la expresión de la MMP-7 (80).

1.2.10. Metaloproteasas y la aterosclerosis

La inflamación y la actividad proteolítica están fuertemente asociadas con inestabilidad y rotura de la placa (53, 81). Sin embargo, hay pocos estudios que evalúen el valor pronóstico de las MMPs como biomarcadores de inflamación y riesgo de enfermedad cardiovascular, realizados en el contexto de una endarterectomía carotídea (82). Los defectos en la síntesis y degradación de la matriz extracelular se consideran factores clave en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y sus complicaciones trombóticas y en este proceso las MMPs juegan un papel clave (83). Debido a su relevancia en la aterosclerosis, en los últimos años se ha planteado la posibilidad de que los niveles de MMPs puedan utilizarse como marcadores de riesgo vascular (84). Varios estudios han demostrado que los niveles plasmáticos de diferentes MMPs están más elevados en pacientes con aterosclerosis carotídea o ictus isquémico (26, 82, 85-87). En particular, los niveles de MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-12 y TIMP-1 podrían contribuir a la inestabilidad de la placa carotídea (82, 85).

1.2.11. Las metaloproteasas en las enfermedades cardiovasculares

La aterosclerosis conduce de forma inicial a una modificación en el flujo habitual de sangre. Con el tiempo, la aterosclerosis grave puede conducir a hipertensión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, ictus e incluso la muerte. Las MMPs se han relacionado directamente con distintas entidades que per sé, conducen a un agravamiento de la aterosclerosis (88). La hiperglucemia, la dislipemia, la diabetes mellitus y la hipertensión se han relacionado con el aumento de distintas MMPs (89). Concretamente, las MMP-2

y MMP-9, entre otras, dañan las células endoteliales y las células de músculo liso vascular lo que conduce a una liberación de factor de crecimiento tumoral (TGF) que a su vez da lugar a la calcificación y rigidez vascular. Ambas MMPs son expresadas por fibroblastos, cardiomiocitos y macrófagos, mientras que MMP-9 se expresa a su vez en leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos (90). La MMP-2 en particular y su zimógeno (proMMP-2) están elevadas en la diabetes mellitus tipo 2 y en saliva de pacientes con periodontitis aguda (91). Por otra parte, la dislipemia y la alteración del metabolismo lipídico son considerados factores de riesgo cardiovascular independientes. Recientemente se ha observado que la apolipoproteína A-IV puede ser un sustrato de la MMP-7 y la MMP-14, ambas producidas por monocitos activados (92). Los valores de MMP-1 y MMP-7 han sido utilizados para predecir la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca (93). Así pues, la influencia de las MMPs se relaciona con distintas enfermedades cardiovasculares y podría ir más allá de la acción local de éstas sobre la matriz extracelular de la pared vascular.

Sin embargo, los estudios sobre la relación entre las MMPs y la actividad metabólica de la pared vascular, medida mediante tomografía por emisión de positrones con 18 flúor-fluoro-desoxi-glucosa, emisión combinada con tomografía computarizada (^{18}F -FDG-PET/ CT), como medida indirecta de la inflamación carotídea in vivo, han producido resultados contradictorios, si bien en algunos estudios se comprobó una correlación entre la captación carotídea de FDG y los niveles sanguíneos de MMP-1 y MMP-9 (94, 95) en el estudio dal-PLAQUE del fármaco dalcetrapib, no se observó correlación entre los niveles de MMP-3 y MMP-9 y la captación de ^{18}F -FDG-PET carotídea (86).

Nuestro conocimiento de la actividad de las MMPs ha evolucionado en las últimas décadas. Actualmente, la evidencia sugiere que las MMP-2 y MMP-9 (gelatinasas), la MMP-10 (estromalisina 2) y la MMP-7 (matrilisina) además de desempeñar un papel importante en la fisiopatología del proceso aterotrombótico pueden ser de utilidad como biomarcadores de riesgo aterosclerótico y predictores de recurrencia de enfermedad cerebrovascular (84). A saber, la actividad de las MMP-2 y MMP-9 ha demostrado ser indispensable en la neovascularización de la placa aterosclerótica y, por ende, en la vulnerabilidad de ésta (96). La MMP-10, por su parte, se ha demostrado en concentraciones elevadas en sujetos asintomáticos con un perfil pro-inflamatorio (97). También se objetivó una adecuada correlación entre los valores de MMP-9, MMP-10 y los del espesor íntima-media carotídea en sujetos sin historia vascular previa. Además, la MMP-10 se ha determinado en el estudio histológico de placas carotídeas avanzadas procedentes de endarterectomía (97-99).

Razonablemente, cuanto mayor es la inflamación en una región y mayor número de macrófagos, mayor es la expresión de MMPs. De la misma forma, distintos mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa, ($TNF\alpha$) y la interleucina 1 (IL-1), se ven incrementados y regulan, a su vez, la expresión de las MMPs (100). El estudio in vitro de células de músculo liso vascular demostró un aumento de MMP-9 inducido por proteína C reactiva (PCR). La correlación entre la PCR y la MMP-9 en pacientes con síndrome coronario agudo podría explicar el elevado riesgo de eventos coronarios en sujetos con niveles de PCR elevados en sangre (101).

En pacientes con síndrome metabólico se ha observado elevación de los niveles circulantes de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 y del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) al ser comparados frente a controles sanos (102).

1.3. EL VALOR DE LA PET EN EL ESTUDIO VASCULAR

1.3.1. Bases

Debido a su mayor resolución espacial (≈ 5 mm), la tomografía por emisión de positrones (PET) se consideró como una herramienta más útil para el estudio del metabolismo vascular, en lugar de otras técnicas de medicina nuclear como imágenes planares o SPECT, con una resolución en torno a 1,5 cm.

El transporte intracelular de glucosa está mediado mayoritariamente por transportadores GLUT. En el ser humano GLUT 1-4 y 6 son los más prevalentes. El análogo de glucosa 2-desoxi-D-glucosa (2DG), tiene una sustitución de hidrógeno por un grupo hidroxilo en el carbono 2 (C2). Esto provoca que esta molécula pueda entrar en la célula y ser fosforilada por la hexoquinasa a 2DG-6-fosfato que no puede ser utilizada para glucogénesis, glucólisis ni en la vía de las pentosas fosfato, por lo que se acumula en el citosol. Tras el marcaje del 2DG con el isótopo radiactivo ^{18}F , se genera fluorodesoxiglucosa (FDG). La degradación del ^{18}F emite un positrón que, al colisionar con un electrón, produce dos fotones de aniquilación de 511 KeV, detectados por la cámara PET. De esta forma se puede valorar la tasa metabólica de los tejidos. Esto es aplicable tanto en oncología como en el estudio de enfermedades inflamatorias (103, 104).

1.3.2. Primeros estudios de PET vascular

Los primeros estudios en modelos animales, a finales de los 90, demostraron captación del ^{18}F -FDG en el arco aórtico de conejos alimentados con una dieta rica en colesterol (105). Posteriormente, utilizando un modelo similar, se constató una reducción marcada de dicha captación tras la retirada del colesterol de la dieta (106). Más adelante, el estudio anatomopatológico vascular de conejos con hipercolesterolemia hereditaria, encontró una clara relación entre la cantidad de macrófagos y la captación de ^{18}F -FDG, pero no entre dicha captación y el grosor de la capa íntima vascular (107).

1.3.3. SUV o TBR

Habitualmente la captación del radiotrazador se ha medido en torno al mínimo y máximo valor de captación estandarizado, SUV. El SUV_{max} o SUV_{min} se mide en la región de interés (siglas en inglés: ROI). Para mejorar su reproducibilidad, el grupo de Rudd y colaboradores recomendó en 2007 la utilización de un nuevo parámetro, el *target to background ratio* (TBR), producto del cociente entre el máximo/ mínimo SUV y una captación media venosa, estimada a partir del valor obtenido en la vena yugular o vena cava (108). Tanto el SUV como el TBR carecen de unidades. En 2014, un estudio de 32 pacientes a los que se les realizó endarterectomía, se comparó SUV y TBR y se observó mejor correlación del TBR con la inflamación de la placa en el estudio histológico (109). Si bien, su utilización en lugar del SUV sigue siendo motivo de debate puesto que actualmente algunos grupos utilizan el SUV y otros el TBR. El TBR no se ha extendido totalmente por lo que ambos métodos se siguen utilizando indistintamente (110). Tras esto, se publicaron las recomendaciones de la Asociación Europea de Medicina Nuclear (EANM), que incluyen la utilización del

TBR en lugar del SUV, la dosis del radioisótopo inyectada y límites de glucemia previa al estudio (111).

1.3.4. Primeros estudios en humanos

En 2001, el estudio retrospectivo de 137 pacientes en los que se había realizado FDG-PET para analizar su estadio oncológico, se determinó la presencia de captación en la pared vascular del 50% de los pacientes, y se observó una clara correlación con factores de riesgo vascular, principalmente con la edad (112). El primer estudio observacional prospectivo en humanos se realizó en 8 pacientes con enfermedad carotídea sintomática. Se combinó, como se haría en adelante, con imágenes de tomografía computarizada (TC) para aumentar la resolución espacial. En aquellos pacientes con ateromatosis en ambas carótidas la tasa de acumulación de ^{18}F -FDG del lado sintomático fue un 27% superior que la del contralateral (113). No obstante, un estudio similar que combinaba resonancia magnética (RM) con FDG-PET, no objetivaron diferencias significativas en la captación del radiofármaco entre el lado en el que se definió la presencia de una placa mediante RM y el lado contralateral (114).

1.3.5. FDG-PET en el estudio de hipolipemiantes

En 2006, se completó un ensayo en el que 43 pacientes consecutivos fueron asignados a recibir tratamiento hipolipemiante con simvastatina o dieta. Tras tres meses se observó un descenso en la captación del ^{18}F -FDG en la aorta torácica y arterias carótidas de los pacientes en tratamiento con la estatina. Además, la atenuación en la captación de las placas se correlacionó positivamente con los niveles de colesterol HDL (115).

En 2010 y 2012 se publicaron 2 estudios que demostraron atenuación significativa de la captación arterial de ^{18}F -FDG en varios territorios además del

carotídeo tras tratamiento con dosis 20 mg y 40 mg de atorvastatina (116, 117). Posteriormente, se utilizó el FDG-PET para observar el efecto sobre las placas de fármacos en ensayo clínico como con el losmapimod, un inhibidor de MAPK p38 (118) y el dalcetrapib, un inhibidor de la proteína inhibidora del transporte de los ésteres de colesterol (119), que demostraron disminución del TBR del segmento con más ateromatosis del territorio carotídeo y aórtico tras el tratamiento (86).

1.3.6. ¿Qué está mostrando la FDG-PET vascular?

Con el objetivo de entender el mecanismo subyacente a la captación de las placas de aterosclerosis, en 17 pacientes con estenosis carotídea grave, en los que se realizó endarterectomía, se constató un aumento de la densidad de macrófagos, mediante una tinción para CD68, en relación con la captación de ¹⁸F-FDG (113). El estudio de la composición de las placas, mediante RM y TC, estableció tres grupos de placas: placas ricas en colágeno, placas con núcleo necrótico-lipídico y aquellas con mayor contenido de calcio. La inflamación estimada mediante FDG-PET fue claramente mayor en las placas ricas en lípidos (más vulnerables) respecto a los otros 2 grupos, que demostraron valores de TBR similares. Además, se objetivó mayor valor de TBR en relación con mayor grosor de la placa, a partir de 19 mm, únicamente en las placas lipídicas (120). Otros autores (36) también mostraron que la cuantificación de la inflamación intraplaca en la arteria carótida se correlaciona con el grado de inflamación en la histología. Sin embargo, el estudio de Kwee y colaboradores no observó una correlación significativa entre la composición de la placa y su comportamiento con FDG-PET (121).

1.3.7. PET y riesgo vascular

A pesar de la aparente relación entre la captación de ^{18}F -FDG en zonas de inflamación, se ha discutido la posibilidad de que la captación que se observa en las carótidas se corresponda con otros fenómenos como la neoangiogénesis (122) y la hipoxia (123). Sin embargo, sí que se pudo establecer que el incremento en la captación de ^{18}F -FDG se relaciona con desestabilización reciente de la placa causante de ictus, accidentes isquémicos transitorios (AITs) (124) y microembolismos (125). En un estudio de Ogawa y colaboradores (126) se demostró que la captación de ^{18}F -FDG se correspondía con la presencia de células espumosas, derivadas de macrófagos y células de músculo liso vascular, en su fase más inicial, previa a la diferenciación. Tras la diferenciación a células espumosas maduras cambia la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y se expresa el transportador de glucosa 1 (GLUT-1). En esta fase no se observó correlación con la captación de ^{18}F -FDG (126). Para comprobar la relación entre la captación de ^{18}F -FDG a nivel carotideo y la presencia de factores de riesgo (circunferencia de la cintura, hipertensión arterial, resistencia a la insulina, grosor íntima-media carotideo, niveles de colesterol HDL -relación inversa-), se realizó un estudio prospectivo de 236 pacientes que demostró una correlación significativa con todos ellos y, en definitiva, entre el "síndrome metabólico" y la captación carotídea en PET (127).

En un estudio de 2008, se observó cómo en 2000 pacientes con cáncer en situación estable, la mayor captación vascular en PET se correspondió con mayor riesgo de eventos vasculares en los siguientes 6 meses. Un año después, en el seguimiento de 932 pacientes en una situación similar, objetivó que dicho aumento del riesgo se producía por encima de una media de TBR > 1,7 (128).

En contraposición con los estudios iniciales, la mayoría de los cuales fueron retrospectivos y sobre pacientes oncológicos, se completó un estudio prospectivo con mayor potencia estadística que involucró a 100 sujetos (63 ± 10 años; 64 hombres, 36 mujeres) sin historia de enfermedad cerebrovascular, en los que se realizaban a su vez ecografía-Doppler carotídea para cribado de aterosclerosis. Se comprobó una captación sugestiva de inflamación, definida como $SUV \geq 1,60$, en el 29% de los sujetos con aterosclerosis y 10% de los sujetos sin aterosclerosis (129). En los últimos años, se han realizado estudios prospectivos con mayor número de pacientes, que ha ratificado la potencial utilidad del FDG-PET para diferenciar entre placas sintomáticas y asintomáticas (35). El estudio prospectivo de 1089 adultos asintomáticos, con una edad media de $51,8 \pm 6,3$ años, en su mayoría varones, supone el mayor estudio en asintomáticos hasta la fecha. Durante un seguimiento de 4,2 años (rango 1,0-5,5) se produjeron eventos vasculares en 19 pacientes. La captación carotídea elevada fue un factor de riesgo independiente de los factores de riesgo tradicionales, evaluados mediante la puntuación de Framingham, y el grosor íntima-media (130). La captación en la aorta ascendente, medida mediante TBR, fue capaz de mejorar la predicción de eventos vasculares en una cohorte de pacientes en los que se realizaba cribado oncológico. Cabe destacar que los valores de TBR estaban inversamente relacionados con el tiempo hasta el evento vascular (131).

1.3.8. FDG-PET y otros marcadores de aterosclerosis

En 2009, un estudio prospectivo de pacientes a los que se les realizó endarterectomía carotídea por aterosclerosis, confirmó la correlación entre captación de ^{18}F -FDG y la expresión génica de MMP-9, además del marcador

de macrófagos CD68 (132). Este mismo grupo demostró posteriormente y en similares condiciones, buena correlación de la captación con la expresión de genes marcadores de angiogénesis (CD-34, $\alpha\beta 3$, *vascular endothelial growth factor* -VEGF-) (133) e hipoxia (HIF-1 α) (134). Más recientemente, se demostró que los niveles séricos de colesterol total y colesterol LDL estaban asociados a la captación en FDG-PET de la carótida sintomática y aguda, es decir, cuya ruptura había sido reciente (130). Esto refrenda el conocimiento teórico y experimental que sugiere que los lípidos promueven la inflamación de la placa y su ruptura (135). Además, se ha documentado una correlación entre la captación carotídea en la ^{18}F -FDG-PET/CT, con los niveles sanguíneos de MMP-1 y MMP-9 (94, 136).

1.3.9. FDG-PET vascular en la actualidad

En 2019, se publicó el estudio prospectivo de Kelly y colaboradores (137) que incluía pacientes en dos cohortes en Barcelona y Dublín, con un total de 192 pacientes con enfermedad carotídea sintomática. Se utilizó el SUV_{max} como medida de captación. Durante el periodo de seguimiento de 90 días se sucedieron 37 ictus, 29 de ellos antes del FDG-PET. El *hazard ratio* ajustado para la recurrencia de ictus tras la PET fue de 4,57 (IC 1,5-13,96; $p=0,008$) por lo que los autores establecieron la potencial capacidad de la FDG-PET vascular de predecir recurrencia de ictus.

También en 2019, 755 participantes del estudio *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis* (PESA) realizado en trabajadores del banco Santander demostró captación sugestiva de inflamación arterial al estudiar varios territorios vasculares mediante FDG-PET combinado con resonancia magnética. La aterosclerosis subclínica en sujetos de mediana edad ($49,6 \pm 4,3$ años) se

correlacionó con inflamación arterial. No obstante, la mayor parte de las regiones con captación de FDG se correspondieron con segmentos arteriales sin placas de aterosclerosis o con placas ricas en lípidos. Éste último hallazgo sugeriría que la inflamación arterial es predominante en la aterosclerosis en estadios iniciales (138).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. Hipótesis de trabajo

En los últimos años existe un interés creciente en identificar a aquellos sujetos con placas de ateroma carotídeas vulnerables. El estudio de pacientes con estenosis carotídea debería incluir exploraciones que permitan establecer si la placa de ateroma es vulnerable y por tanto tiene alto riesgo de ruptura y embolización. La inflamación en el interior de la placa podría asociarse a una mayor vulnerabilidad independientemente del grado de estenosis. En definitiva, nuestra hipótesis primaria es que el estudio de la vulnerabilidad de la placa a través de técnicas de imagen y/o biomarcadores plasmáticos de inflamación y degradación de la placa como las MMPs, podrían ser indicadores pronósticos, más allá del grado de estenosis que es el patrón oro o *gold standard* que determina el tratamiento en la actualidad. En la actualidad, diferentes técnicas de imagen, como el ^{18}F -FDG-PET / CT, permiten la detección *in vivo* de inflamación en el interior de la placa ateromatosa carotídea de forma no invasiva, lo que podría correlacionarse con la vulnerabilidad de la placa y el riesgo de eventos vasculares a largo plazo. Por otro lado, entre los mediadores inflamatorios que participan en los fenómenos inflamatorios intraplaca y en la ruptura de la placa destacan las MMPs. El aumento de algunas MMPs se asocia con la presencia de macrófagos en el interior de la placa y una mayor vulnerabilidad de la placa carotídea. El estudio de la presencia de inflamación y de los niveles circulantes de las MMPs y sus inhibidores podría permitir la detección no invasiva de las placas vulnerables, mejorar la selección de los pacientes candidatos a endarterectomía carotídea, predecir el riesgo de eventos vasculares y abrir una nueva vía terapéutica para la estabilización de la placa y por tanto para el tratamiento de la aterosclerosis.

Secundariamente, hipotetizamos que si, como se ha descrito, el ^{18}F -FDG-PET / CT es una buena medida de la inflamación de las placas podría existir una correlación entre el grado de inflamación intraplaca medido mediante ^{18}F -FDG-PET / CT y la presencia de macrófagos que expresan la glicoproteína CD68 puesto que participan en la captación de lipoproteínas de baja densidad.

OBJETIVOS

3. Objetivos

1. Comparar el grado de inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante ^{18}F -FDG-PET / CT en pacientes con estenosis carotídeas graves sintomáticas frente a las asintomáticas.
2. Determinar si existe un incremento en los niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de sus inhibidores (TIMP-1) en pacientes con estenosis carotídeas graves respecto a controles sanos.
3. Establecer si existe relación entre los niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de sus inhibidores (TIMP-1) y la actividad inflamatoria de la placa de ateroma estudiada mediante ^{18}F -FDG-PET / CT.
4. Correlacionar la inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante ^{18}F -FDG-PET / CT y los niveles de metaloproteasas/ inhibidores, con la presencia de nuevos eventos isquémicos tras un seguimiento de al menos 12 meses.
5. Estudiar la presencia de metaloproteasas en el estudio histológico de las placas y su correlación con los niveles circulantes de MMPs. Estudio de la densidad de células que expresan el marcador macrofágico CD68 en la pieza quirúrgica extraída mediante endarterectomía.
6. Correlacionar el valor de captación de ^{18}F -FDG-PET / CT observado en la lesión ateromatosa carotídea con la presencia de CD68 intraplaca.

PACIENTES Y MÉTODOS

4. Pacientes y Métodos

4.1. Pacientes y controles

Estudio de cohorte prospectivo, longitudinal multicéntrico. Se incluyeron pacientes atendidos en la Unidad de Ictus del Hospital de Navarra y en el departamento de Neurología de la Clínica Universidad de Navarra con edades comprendidas entre 50-80 años con ateromatosis carotídea grave (>70%) sintomática, y pacientes con estenosis carotídea grave asintomática (véase tabla 1). Los pacientes fueron clasificados como sintomáticos si habían tenido un ictus, AITs o *amaurosis fugax* ipsilateral a la arteria carótida estenótica o asintomáticos si no padecían síntomas, pero se realizaron una ecografía carotídea de cribado debido a la presencia de factores de riesgo cardiovascular que demostró una estenosis grave.

En el caso de los pacientes sintomáticos con ictus, la TC cerebral objetivó hipodensidad y las secuencias de difusión por Resonancia Magnética (RM) demostraron restricción a la difusión en las lesiones isquémicas agudas. Los pacientes con AIT padecieron síntomas de amaurosis fugax o síntomas hemisféricos autolimitados. Entre los pacientes con ateromatosis carotídea >70% asintomática candidatos a cirugía solo se incluyeron en el presente estudio aquellos en los que no se detectaron lesiones cerebrales en secuencias de difusión, T2 y T2-FLAIR por RM.

Los pacientes fueron atendidos por neurólogos especialistas en el diagnóstico y tratamiento del ictus. Todos los pacientes fueron tratados siguiendo las recomendaciones para el tratamiento del ictus del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología

(SEN). Si la persona candidata cumplía los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión (tabla 1), se le explicaron todos los procedimientos que se realizaban en el estudio y debía firmar el documento de consentimiento informado (Anexo 1).

Tabla 1: Criterios de inclusión/ exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Pacientes atendidos en la Unidad de Ictus del Hospital de Navarra y la Clínica Universidad de Navarra.	Pacientes con infarto de miocardio reciente (últimos 3 meses), cirugía reciente (últimos 3 meses), insuficiencia renal, enfermedad inflamatoria o neoplásica.
Edades comprendidas entre 50-80 años.	Enfermedad médica grave que supusiera una esperanza de vida inferior a un año, enfermos inmunodeprimidos o con infección por el VIH, pacientes alcohólicos crónicos o adictos a drogas o pacientes que hubieran recibido fármacos en fase de investigación durante el último año
Diagnóstico de infarto cerebral (con déficit menor) o AIT de origen aterotrombótico por ateromatosis carotídea (grupo sintomático).	Los pacientes portadores de marcapasos, claustrofobia o portadores de dispositivos metálicos no compatibles con RM.
Pacientes con estenosis carotídea asintomática (grupo asintomático).	

Se excluyeron aquellos pacientes con infarto de miocardio reciente (últimos 3 meses), cirugía reciente (últimos 3 meses), insuficiencia renal, enfermedad inflamatoria o neoplásica. También se excluyeron a aquellos pacientes con enfermedad médica grave que supusiera una esperanza de vida inferior a un año, enfermos inmunodeprimidos o con infección por el VIH, pacientes alcohólicos crónicos o adictos a drogas o pacientes que hubieran recibido fármacos en fase de investigación durante el último año. Los pacientes portadores de marcapasos, claustrofobia o portadores de dispositivos metálicos no compatibles con RM fueron también excluidos del estudio.

Se analizaron, en todos los pacientes, los factores de riesgo vascular. Los fumadores activos o los pacientes que habían dejado de fumar en los 2 años previos al reclutamiento se consideraron fumadores. Los antecedentes de ictus previo en pacientes asintomáticos incluyeron ictus de etiología no aterosclerótica.

Asimismo, se incluyó un grupo de 26 controles sanos, sujetos libres de enfermedades cardiovasculares, trabajadores de la Universidad de Navarra, que acudieron a la consulta de Medicina Interna para un chequeo general, de una edad comparable a los pacientes y que no cumplían ninguno de los criterios de exclusión.

Se informó asimismo a todos los participantes del derecho a poder retirarse del estudio en cualquier momento sin que ello les supusiese perjuicio alguno. La participación en el estudio, en ningún caso, causó demora alguna en la realización de los tratamientos médicos y/o quirúrgicos necesarios para la atención del paciente. El proyecto fue aprobado por el comité ético de investigación de la Clínica Universidad de Navarra con el número 058/2012.

4.2. Métodos

El equipo de Neurología evaluó a los pacientes antes de la cirugía. Los pacientes fueron seleccionados para la endarterectomía en base a un consenso entre los miembros del equipo multidisciplinario de enfermedad carotídea, que incluyó cirujanos vasculares, cardiólogos y neurólogos.

Se realizó una extracción sanguínea en ayunas para la determinación de MMPs pacientes y controles. La analítica sanguínea se extrajo en los 2 días previos a la cirugía. Las muestras de los pacientes incluidos en el estudio se almacenaron

el Biobanco de la Universidad de Navarra y se procesaron siguiendo los procedimientos operativos estándar aprobados por los Comités Científico y Ético de Investigación.

En todos los pacientes se realizó, además del protocolo diagnóstico y terapéutico habitual de acuerdo con los criterios del GEECV de la SEN, un estudio dúplex carotídeo para determinar el grado de estenosis, de acuerdo con las últimas guías (139) y un estudio de angiografía por resonancia magnética con secuencias coronales rápidas en 3D potenciadas en T1 tras la administración de una dosis única de contraste de gadolinio intravenoso, con sustracción digital y reconstrucciones de proyección de máxima intensidad, utilizando un escáner de resonancia magnética 3-T (Magnetom Trio Tim, Siemens, Erlanger, Alemania). La medición de la estenosis se realizó siguiendo las recomendaciones de NASCET (140).

La cirugía se realizó por cirujanos vasculares con experiencia en la realización de la endarterectomía carotídea. Todos los procedimientos fueron realizados bajo anestesia general. La placa se intentó extraer de una sola pieza para facilitar el estudio posterior. Las placas de ateroma extraídas mediante endarterectomía se almacenaron en el Biobanco de la Universidad de Navarra y se procesaron siguiendo los procedimientos operativos estándar aprobados por los Comités Científico y Ético de Investigación.

Los datos recogidos se volcaron en una base anonimizada y diseñada específicamente para este estudio.

Por otro lado, a los controles sanos se les realizó una extracción sanguínea en ayunas para la medición de niveles en sangre de MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 y TIMP-1.

4.2.1 Evaluación de biomarcadores

Se recogieron muestras de sangre, precedidas de 12 horas de ayuno, en los 2 días previos a la endarterectomía carotídea en tubos con EDTA y citrato. Para su procesamiento, se dejó coagular la sangre y se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos usando una centrifugadora refrigerada. El suero se extrajo, se alicuotó y se almacenó a -80 ° C hasta su análisis. De igual manera, el plasma se obtuvo a partir de sangre citratada mediante centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos utilizando una centrifugadora refrigerada, se alicuotó y se almacenó a -80 ° C hasta su análisis.

Los niveles de MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-10 se midieron en plasma citratado con un ensayo *multiplex* basado en esferas magnéticas utilizando tecnología Luminex (MILLIPLEX MAP *Human MMP Magnetic Bead Panel 2*, ref. HMMP2MAG-55 K; Merck, Darmstadt, Alemania). Se obtuvo el valor de TIMP-1 en suero usando un *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) específico (Human TIMP-1 Quantikine ELISA Kit, ref. DTM100; R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.). Las MMPs y TIMP-1 se midieron siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo para estos ELISA fueron <6%.

El colesterol sérico total, el colesterol HDL y los triglicéridos se midieron en muestras de sangre en ayunas utilizando técnicas estándar de laboratorio. El colesterol LDL se calculó mediante la ecuación de Friedewald y la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) se midió utilizando un inmunoensayo (Immulite; Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, EE. UU.). La

velocidad de sedimentación globular (VSG) se analizó mediante el método de Westergren (141).

4.2.2. Evaluación histológica

Los segmentos vasculares se extrajeron cuidadosamente (se intentó que la placa fuera extraída en una sola pieza) durante la realización de la endarterectomía para preservar la estructura de la placa. Las muestras de los pacientes sometidos a endarterectomía carotídea se cortaron en trozos transversales y se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4%, se descalcificaron durante 24 a 72 horas a temperatura ambiente (Osteosoft: Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), tras lo cual se embebieron en parafina. Se utilizaron las tinciones de hematoxilina-eosina y tinción de van Gieson para examinar las características morfológicas microscópicas del tejido (Nikon Optiphot-2, Japón). Para la inmunolocalización de proteínas, las secciones de tejido en serie de todos los pacientes se analizaron mediante técnicas de inmuno-histoquímica. La medición del antígeno se realizó utilizando citrato 10 mM, pH 6,0, (MMP-10) o TE, pH 9,0, (MMP-9, TIMP-1, CD68) y una cámara de presión DakoCytomation Pascal (Dako) a 95 ° C durante 30 min. Los portaobjetos se trataron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 10 minutos para bloquear la actividad de peroxidasa endógena, y las secciones se bloquearon con suero normal de cabra al 5% en tampón de fosfato salino (PBS). Las secciones de tejido se incubaron con anticuerpos dirigidos frente a MMP-10 (policlonal de conejo, Acris ref. AP07210PU-N, dilución 1:20), MMP-9 (policlonal de conejo, Thermo Fisher ref. PA5–13199, dil. 1: 800), TIMP-1 (monoclonal de ratón, Merck ref. MAB13429, dilución 1: 400) y CD68 (monoclonal de ratón, Dako

ref. GA609, dilución 1: 2000), como se ha descrito previamente (99). Después del lavado, las secciones se incubaron durante 30 minutos con polímero marcado con *Horseradish Peroxidase-labeled Antibodies* (HRP) conjugado con anticuerpos secundarios anti-conejo (ref. K4003) o anti-ratón (ref. 4001) (Dako). La señal se reveló utilizando el sistema de cromógeno de sustrato diaminobenzidina (DAB +; Dako ref. K3468). Los controles negativos, preparados omitiendo el anticuerpo primario, se incluyeron en cada lote procesado. Tres observadores independientes, cegados a los datos clínicos, utilizaron una escala de clasificación visual semicuantitativa para evaluar la inmunotinción (escala de 0 a 5).

4.2.3. Imagen vascular mediante PET / TC con ^{18}F -FDG

El valor captación máxima estandarizada (SUV_{max}) se utilizó para medir la captación de ^{18}F -FDG en las arterias carótidas ipsilaterales y contralaterales. El TBR se calculó como la relación entre el SUV_{max} medido en la placa aterosclerótica o el vaso arterial y el SUV_{max} de sangre venosa para corregir la captación del *pool* de sangre. La captación venosa se obtuvo del SUV medio en la vena yugular ipsilateral en los estudios carotídeos y de la vena cava inferior para los otros territorios (arco aórtico y aorta abdominal). La evaluación del calcio peri e intraplaca a través del estudio de imagen (TC) se realizó siguiendo el método semicuantitativo de "Calcium score" o CaScore (142). Este método distingue cuatro niveles de calcificación de 0 a 4, donde 0 es la ausencia de calcio y 4 la ocupación de toda la pared vascular por calcio utilizando un corte axial.

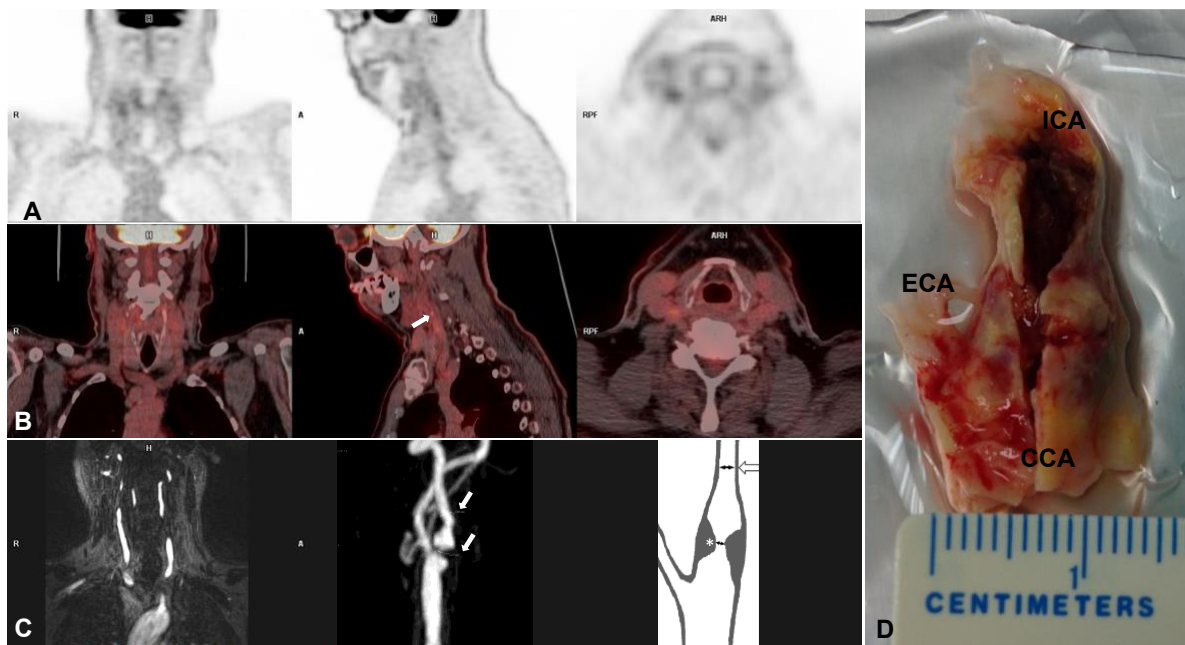


Figura 2. Técnicas de imagen vascular estructural y metabólica.

La imagen de la carótida antes de la endarterectomía se evaluó mediante ^{18}F -FDG-PET combinada con TC (A, B). El panel A muestra las imágenes de ^{18}F -FDG-PET. La ^{18}F -FDG-PET combinada con la TC permite la fusión de imágenes de ambas técnicas y localiza el calcio (flecha blanca) (B). El grado de estenosis se confirmó mediante angiografía por resonancia magnética con imágenes sin procesar y proyección de máxima intensidad con medición de la estenosis (señalado con flechas blancas). Se muestra un dibujo esquemático de la medida de la estenosis (C). La estenosis se midió siguiendo las recomendaciones de NASCET, donde se compara el punto de máxima estenosis (*) con la luz distal de la ACI (flecha). En la última imagen se observa la placa de ateroma eliminada mediante endarterectomía; la cirugía se realizó dentro de la semana siguiente a la obtención de imágenes (D). ICA: arteria carótida interna; ECA: arteria carótida externa; CCA: arteria carótida común.

4.2.4. Seguimiento de los pacientes

Los pacientes fueron seguidos en el servicio de consultas del Departamento de Neurología y / o Cirugía Vascular cada 3 o 6 meses. También se obtuvieron datos de sus visitas al Servicio de Urgencias (mediana de seguimiento 1077 días [rango intercuartílico, 689-1484 días]) hasta mayo de 2018. La variable de

estudio principal, o *primary endpoint* del estudio se definió como la combinación de muerte cardiovascular, un evento cardiovascular no fatal (incluyendo accidente cerebrovascular e infarto de miocardio) o rehospitalización por isquemia aguda (AIT, *amaurosis fugax*, angina de pecho y enfermedad arterial periférica) como se había descrito anteriormente (143). El registro de estos eventos se completó mediante una revisión del historial médico de cada paciente y llamadas telefónicas. El diagnóstico de enfermedad arterial periférica se estableció mediante la combinación de síntomas compatibles, exploración física, índice tobillo-brazo y ecografía dúplex (144). Se realizaron estudios de imagen adicionales (con angiografía por TC, angiografía por resonancia magnética o angiografía por sustracción digital) cuando se consideró el tratamiento mediante revascularización (145). Los pacientes con síntomas de enfermedad coronaria fueron revisados por el equipo de cardiología y se realizó una coronariografía u otras pruebas complementarias de acuerdo con las últimas guías de actuación (146).

Se calculó el período entre la cirugía y el día del evento, y se calculó la supervivencia general y la presencia de eventos cardiovasculares recurrentes desde el día de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento disponible. Ningún paciente se perdió durante el seguimiento.

4.2.5. Análisis estadístico

Todas las variables categóricas se expresan como frecuencias y todas las variables continuas se expresan como la media (\pm error estándar). El análisis estadístico incluyó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. El coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de correlación de Spearman se utilizaron para probar las correlaciones entre MMP y SUV_{max} o TBR. Se realizó una

corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (usando como referencia para el valor p 0,05 dividido por el número de comparaciones). Se utilizó una prueba t de Student para datos no emparejados para comparar los valores de MMP entre los pacientes (sintomáticos y asintomáticos) y controles sanos, y se utilizó un modelo de regresión de Cox para eventos recurrentes con imputación múltiple de datos ausentes para determinar el papel de las MMPs en la predicción de eventos. Las razones de riesgo o *hazard ratios* (HR) se obtuvieron después de ajustar las co-variables relevantes. Se utilizaron curvas de características operativas del receptor (ROC) seguido de un modelo de regresión logística multivariante para analizar la capacidad de MMP-7 para predecir eventos en la cohorte de pacientes con estenosis carotídea grave, sintomáticos y asintomáticos. La puntuación o *score* para evaluar el riesgo vascular global mediante la ecuación de Framingham-Wilson, se utilizó para agrupar factores de riesgo como la edad, el sexo, el tabaquismo, los niveles de colesterol, la hipertensión y la diabetes mellitus (131). Considerando que la población de Navarra tiene niveles más altos de colesterol HDL de media que el resto de la población española, se utilizó una versión adaptada específicamente de dicha ecuación: puntuación de Riesgo para eventos CORonarios en la población de NAVarra (RICORNA) (147). La significación estadística se estableció en $p < ,05$, y el análisis estadístico, incluidos los cálculos del tamaño muestral, se realizó utilizando el paquete de software Stata versión 15.1 para Mac (StataCorp; College Station, TX, EE. UU.). El tamaño de la muestra disponible es pequeño, razón por la cual se realizaron algunos análisis no paramétricos. Para un análisis de regresión de Cox, este tamaño de muestra junto con un nivel de significación de 0,05 y una potencia estadística de 0,20 que permite la detección de HR de

tamaño menor que 0,0001 asumiendo una desviación estándar de 0,04, lo cual es razonable ya que para eso obtenemos una HR de 0,006. Para la mayor desviación estándar (tenemos 2,7), se pudo detectar una HR de tamaño 0,8300, lo cual es razonablemente bueno ya que obtuvimos una HR de 1,7.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Estudio descriptivo de la muestra

5.1.1. Pacientes

Se reclutaron 32 pacientes consecutivos con estenosis carotídea grave ($\geq 70\%$) sintomática o asintomática que estaban programados para endarterectomía carotídea en la Clínica Universidad de Navarra o el Hospital de Navarra entre julio de 2013 y marzo de 2016 y que cumplían los criterios de inclusión. No se incluyó ningún paciente en el postoperatorio y se excluyó a los pacientes en los que se encontró evidencia de infección activa, enfermedad inflamatoria generalizada o local (al margen de la aterosclerosis), enfermedad renal crónica, enfermedad neoplásica o si estaban en hemodiálisis. Se obtuvo un historial médico completo de todos los pacientes, incluidos los antecedentes de accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, enfermedad coronaria (infarto de miocardio, angina o revascularización), claudicación intermitente, hipertensión arterial, tabaquismo, diabetes mellitus, índice de masa corporal y grado de estenosis carotídea bilateral y medicación actual y previa

Finalmente, la cohorte de estudio incluyó 31 sujetos (edad media \pm desviación estándar $67,4 \pm 2,6$ años, 21 hombres) tras la exclusión de un paciente con estenosis carotídea asintomática por diagnóstico de neoplasia de vejiga detectado tras realizarle el estudio ^{18}F -FDG-PET / CT.

De entre los pacientes, 23 presentaban ateromatosis carotídea sintomática y 8 eran asintomáticos. Las tasas de hipertensión y diabetes mellitus fueron similares en ambos grupos de pacientes, mientras que otros factores de riesgo

como el hábito tabáquico y el consumo de estatinas, fueron más frecuentes en los asintomáticos (Tabla 2).

5.1.2. Controles

Se incluyó una población de 26 controles sanos (16 hombres) con una edad media $66,8 \pm 3,0$ años, comparable en edad y sexo a la población de pacientes.

Las características de los pacientes están resumidas en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los pacientes.

Historia clínica y características	Sintomáticos (n= 23)	Asintomáticos (n= 8)	P-valor	Controles (n= 26)	P-valor	
Edad, (años)	67,3 (16,0)	66,3 (22,5)	<i>P</i> = ,4	66,8 (3,0)	<i>P</i> = ,4	DE desviación estándar
Sexo masculino n (%)	15 (65)	6 (75)	<i>P</i> = ,3	16 (62)	<i>P</i> = ,3	AIT ataque isquémico
Hipertensión n (%)	17 (74)	6 (75)	<i>P</i> = ,6	0		transitorio
Diabetes melitus n (%)	8 (35)	2 (10)	<i>P</i> = ,6	0		IMC índice de masa
Prediabetes n (%)	1 (4)	2 (25)	<i>P</i> = ,12	0		corporal
Enfermedad coronaria n (%)	7 (30)	1 (12)	<i>P</i> = ,4	0		N/A no aplica
Tabaco n (%)	12 (52)	7 (87)	<i>P</i> = ,1	0		VSG velocidad de
Previo ictus/AIT n (%)	4 (17)	2 (25)	<i>P</i> = ,5	0		sedimentación globular
IMC, kg/m ² (DE)	27,5 (1,1)	29,2 (1,3)	<i>P</i> = ,7	N/A		hs-CRP <i>high-sensitivity C</i>
Grado de estenosis ipsilateral % (DE)	82,6 (16,2)	85,0 (14,2)	<i>P</i> = ,6	N/A		<i>reactive protein</i>
Grado de estenosis contralateral % (DE)	37,4 (25,0)	35,0 (23,2)	<i>P</i> = ,7	N/A		LDL <i>low-density</i>
Medicación						<i>lipoprotein</i> , HDL <i>high-</i>
Estatinas n (%)	13 (57)	7 (87)	<i>P</i> = ,4	0		<i>density lipoprotein</i> ,
Antiagregantes n (%)	11 (48)	7 (87)	<i>P</i> = ,04	0		
Anticoagulantes n (%)	0	1 (12)	<i>P</i> = ,02	0		
Análisis sanguíneo						
Leucocitos, 10 ⁹ /l (DE)	7,69 (0,43)	7,50 (0,73)	<i>P</i> = ,4	N/A		Los datos están presentados
Plaquetas, 10 ⁹ /l (DE)	210,3 (10,1)	210,7 (13,5)	<i>P</i> = ,5	N/A		como número total
VSG, mm/h (DE)	10,86 (1,30)	4,83 (1,25)	<i>P</i> = ,03	N/A		(porcentaje) o media
hs-CRP, mg/l (DE)	1,94 (0,41)	1,38 (0,74)	<i>P</i> = ,3	N/A		(desviación estándar).
Colesterol LDL, mg/dl (DE)	102,3 (6,2)	80,0 (10,0)	<i>P</i> = ,04	N/A		
Colesterol HDL, mg/dl (DE)	44,3 (2,4)	49,7 (5,8)	<i>P</i> = ,8	N/A		
Triglicéridos, mg/dl (DE)	119,4 (14,5)	134,6 (27,4)	<i>P</i> = ,6	N/A		

5.2. Comparación del grado de inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante PET-FDG en pacientes con estenosis carotídeas sintomáticas frente a las asintomáticas.

La imagen de ^{18}F -FDG-PET / TC centrada en el metabolismo de la pared vascular se realizó en 29 de los 31 pacientes (figura 3), ya que no había disponibilidad a lo largo de las 2 semanas previas a la cirugía para realizar PET-FDG en 2 pacientes sintomáticos. La inflamación medida a través del PET-FDG de las placas de carotídeas en pacientes sintomáticos y asintomáticos arrojó valores similares (tabla 3). El estudio mediante U de Mann-Whitney, seleccionado por el número de pacientes en la muestra, fue de $U=77,5$, (mediana en sintomáticos= 2,5; rango intercuartílico 2,18-3,205 = 1,025); mediana en asintomáticos= 2,695; rango intercuartílico 2,48-2,995 = 0,515) con un valor P de 0,4354, por lo que no podemos establecer la existencia de una diferencia en la media de SUV_{max} entre grupos. La comparación entre los valores de TBR del lado sintomático o con $>70\%$ de estenosis en asintomáticos, respecto al contralateral, con estenosis comprendidas entre 30% y 70%, en los 31 pacientes, se realizó mediante una t de Student pareada que arrojó un valor de t de -1,224402, (media en sintomáticos ipsilateral = 1,88; rango intercuartílico = 1,625-2,135 = 0,51; media en sintomáticos contralateral = 1,76; rango intercuartílico = 1,5-1,91 = 0,41) lo que corresponde con un valor P a una cola de ,11533, no significativo. Por otra parte, en consonancia con la noción de la enfermedad aterosclerótica como una enfermedad sistémica en la que un mismo vaso a lo largo de su recorrido y varios vasos de distintos territorios pueden verse afectados simultáneamente, observamos una buena correlación estadística entre los TBR de territorios vecinos. La correlación de TBR de la carótida interna

y la carótida común con los valores contralaterales fue de $r=0,63$ y $r=0,72$, respectivamente. Encontramos una correlación fuerte ($r=0,63$) entre la captación de radiofármaco medida a través de SUV en carótidas y en ilíacas. Los valores de SUV_{max} de arterias ilíacas pueden observarse en la tabla 4.

Tabla 3. Valores de SUV_{max} carotídeos de sintomáticos y asintomáticos.

Sintomáticos N=23	Asintomáticos N=8
2,91	3,4
2,4	2,58
2,28	2,76
2,91	3,23
2,39	2,64
2,68	2,75
2,2	2,38
2,5	1,92
3,27	
2,48	
2,34	
2,76	
1,92	
1,64	
3,37	
3,14	
2,75	
2,16	
3,54	
2,24	
1,83	
2,86	



Figura 3. Fusión de ¹⁸F-FDG-PET con la TC.

Imagen de ¹⁸F-FDG-PET / TC que muestra la captación de una placa carotídea calcificada (flecha blanca) en un paciente sintomático tras un AIT.

Tabla 4. Valores de SUV_{max} ilíacas de sintomáticos (carotídeos) y asintomáticos.

Arteria iliaca derecha		Arteria iliaca izquierda	
Sintomáticos N=23	Asintomáticos N=8	Sintomáticos N=23	Asintomáticos N=8
2,76	3,59	2,92	2,37
2,24	2,14	3,07	1,78
2,52	2,65	2,61	1,04
2,25	2,76	2,25	2
2,44	2,65	1,68	1,92
3,05	3,3	3,43	1,74
2,35	1,14	2,32	1,98
1,69	3,59	1,81	1,12
2,55		2,73	
2,47		2,36	
2,22		2,78	
2,22		2,62	
2,17		1,83	
1,94		1,64	
2,7		2,18	
4,01		2,95	
1,81		1,95	
3,88		3,25	
2,02		2,06	
2,51		2,41	
3,15		2,86	
3,27		2,84	

5.3. Niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de su inhibidor (TIMP-1) en pacientes con estenosis carotídea sintomática y asintomática, y controles sanos.

En nuestra cohorte de pacientes no pudimos observar una diferencia significativa entre los valores de MMPs de pacientes sintomáticos y asintomáticos. No obstante, estos hallazgos eran esperables dado el reducido número de pacientes especialmente en el grupo de asintomáticos (N=8) y la similitud en los valores de SUV_{max} carotídeos de ambos grupos (véase 5.2).

Por otro lado, la comparación entre los niveles basales de MMPs y el grupo de controles sanos fue significativamente superior en el grupo pacientes para los valores de MMP-1, MMP-7 y MMP-10, como puede observarse en la tabla 5. No se observaron diferencias entre pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Tabla 5. Niveles plasmáticos basales de MMPs y TIMP-1.

Biomarcador	Pacientes (n=31)	Controles (n= 26)	P-valor
MMP-1, ng/ml	11,8 (9,5)	6,2 (4,1)	p=,003
MMP-2, ng/ml	125,3 (6,5)	135 (6,4)	p=,3
MMP-7, ng/ml	20,4 (6,4)	17,5 (4,1)	p=,02
MMP-9, ng/ml	117,8 (10,7)	123,5 (12,4)	p=,7
MMP-10, pg/ml	726,7 (81,6)	513,2 (40,0)	p=,01
TIMP-1, ng/ml	211,6 (9,4)	195,5 (8,1)	p=,2

MMP metaloproteasa; TIMP inhibidor tisular de metaloproteasas.

5.4. Relación entre los niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de su inhibidor (TIMP-1) y la actividad inflamatoria de la placa de ateroma estudiada mediante PET-FDG.

No se encontró una correlación significativa entre los niveles sanguíneos de MMPs y el SUV de la arteria carótida sintomática (Tabla 6) o la arteria carótida contralateral (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares con la TBR normalizada para la arteria carótida ipsilateral o para la arteria carótida contralateral (datos no mostrados). Los valores de SUV_{max} se correlacionaron consistentemente entre territorios vecinos (carótida y arco aórtico, $r = 0,41$ $p = 0,03$; carótida y aorta abdominal, $r = 0,51$ $p = 0,02$). Sin embargo, ninguno de los niveles sanguíneos de MMPs se correlacionó con la captación de ^{18}F -FDG en el arco aórtico o la aorta abdominal (ver tabla 6).

Tabla 6. Correlaciones entre niveles sanguíneos de MMPs y captación de ^{18}F -FDG (SUV_{max}).

	Captación de la carótida sintomática	P-valor	Captación del arco aórtico	P-valor	Captación de la aorta abdominal	P-valor
MMP-1	-0,05	0,77	-0,07	0,68	0,15	0,4
MMP-2	-0,01	0,95	0,01	0,95	0,05	0,78
MMP-7	-0,20	0,28	-0,28	0,12	0,12	0,53
MMP-9	-0,28	0,13	-0,11	0,57	0,09	0,62
MMP-10	-0,19	0,33	-0,14	0,46	0,07	0,71
TIMP-1	0,05	0,78	-0,29	0,12	-0,17	0,36

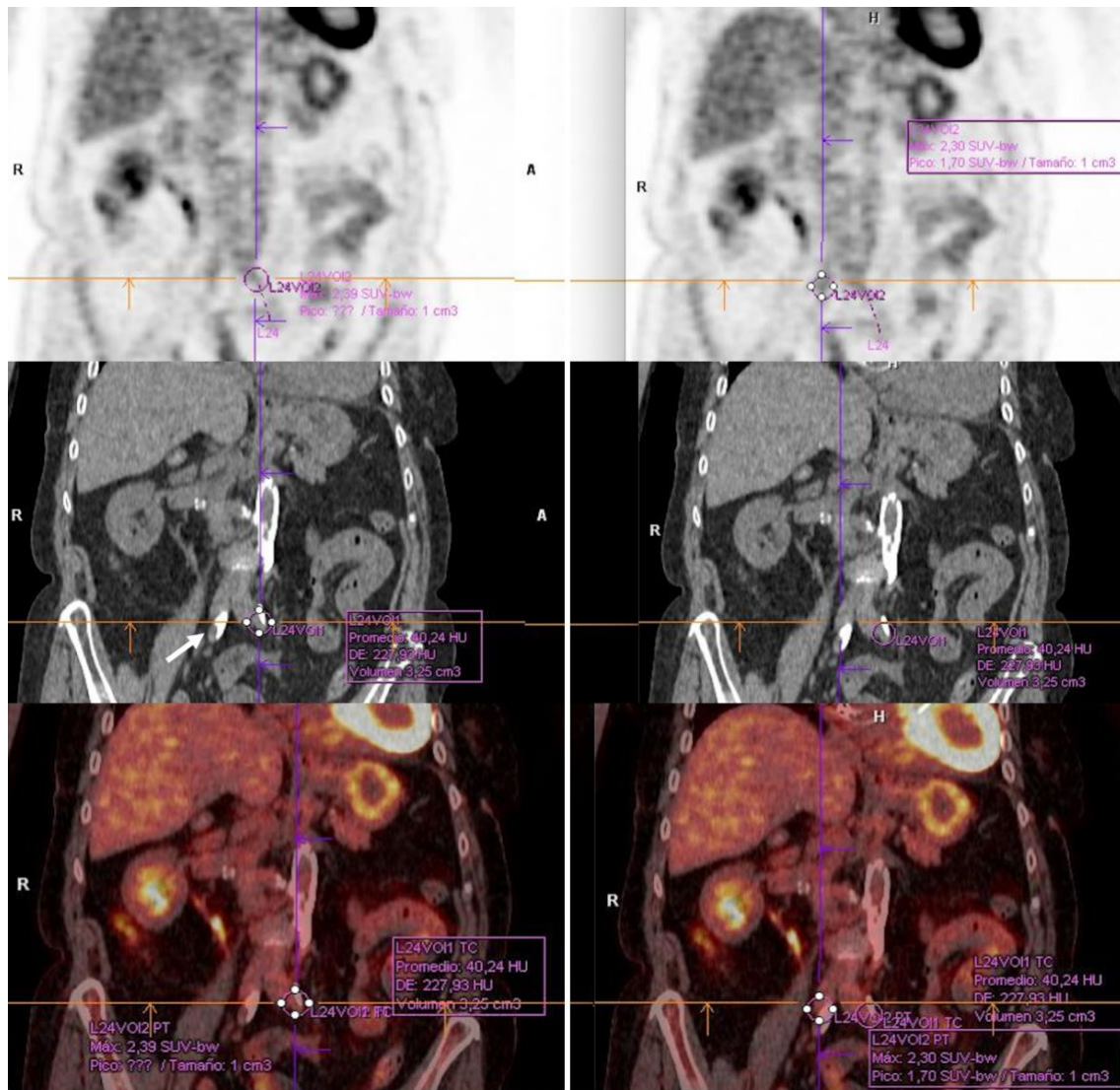
MMP metaloproteasa; TIMP inhibidor tisular de metaloproteasas.

Como se ha comentado previamente (véase 5.2), encontramos una correlación fuerte ($r=0,63$) entre el SUV_{max} hallado en carótidas y en arterias ilíacas (figura 4).

5.5. Morfología de las placas. Calcificación en imagen TC

La inmensa mayoría de las placas carotídeas observadas en la imagen de TC estaban calcificadas, es decir, contaban con áreas de >130 unidades Hounsfield (UH). Únicamente se objetivó la ausencia de calcificación (<130 UH) en tres de las placas sintomáticas o de mayor grado de estenosis en caso de pacientes asintomáticos (9%) y en un 25% de las placas contralaterales (8/31) ($\chi^2 = 2,74$ $P = 0,097$). La mediana del grado de circunferencia ocupada por calcificación (CaScore) del lado sintomático o de interés (1 = 0-25%; 2 = 25%-50%; 3 = 50%-75%; 4 = >75%) fue de 3 (con una media de 2,6), rango intercuartílico = 1,5-4 = 2,5. En el lado contralateral, el CaScore obtuvo una mediana de 2 (media de 2,04), rango intercuartílico = 1,5 – 3 = 1,5). La diferencia entre los CaScore del lado sintomático y asintomático se calculó mediante el test de la U de Mann-Whitney para la comparación de medianas ($z = 1,6185$ $P = 0,052$). Estos datos muestran una mayor circunferencia de calcificación del lado sintomático, con la diferencia respecto al lado asintomático al borde de la significación estadística.

Se observó que la captación de FDG no se correspondía con zonas calcificadas de los vasos que, razonablemente, están en un estadio posterior al de la fase inflamatoria. La correlación entre la inflamación, medida a través de PET-FDG y el CaScore fue negativa y estadísticamente significativa, con una $r = -0,41$ $P = 0,021$ (figura 4).



AII

AID

Figura 4. Captación de arterias ilíacas.

Estudio de imagen ¹⁸F-FDG-PET / TC centrado en las arterias ilíacas. La primera fila se corresponde con el estudio FDG-PET, la segunda con la TC y la tercera con la fusión de ambas. Las imágenes de la izquierda se centran en la arteria ilíaca izquierda (AII) y las imágenes de la derecha en la arteria ilíaca derecha (AID). Se observa una mayor calcificación de la AID (flecha blanca) lo que se corresponde con una menor captación del radiotrazador (véase la primera fila), SUV_{max} AII 2,39 vs. 2,30 AID.

5.6. Correlación entre la inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante PET-FDG y los niveles de metaloproteasas/inhibidor, con la presencia de nuevos eventos isquémicos tras un seguimiento de al menos 12 meses.

Después de un seguimiento medio de 1004 días, se registraron 4 eventos cerebrovasculares (2 ictus isquémicos y 2 ataques isquémicos transitorios), 7 cardiovasculares (4 infartos de miocardio, 3 angina de pecho) y 11 eventos vasculares periféricos que requirieron hospitalización. No se registraron muertes durante el seguimiento. Como era de esperar, la puntuación de riesgo RICORNA predijo eventos futuros (HR = 1,08 p = ,002). Cuando se agregaron otras variables al modelo (tabla 7), la MMP-7 circulante fue la única MMP capaz de mejorar el valor predictivo de RICORNA (HR = 1,15 p = 0,006).

Tabla 7. Variables del modelo.

Variable	Tipo	Descripción
TBR carótida	Cuantitativa continua	Valor de captación SUV _{max} dividido entre el SUV _{max} de la vena cava.
TBR carótida contralateral	Cuantitativa continua	Valor de captación SUV _{max} dividido entre el SUV _{max} de la vena cava.
TBR ilíacas	Cuantitativa continua	Valor de captación SUV _{max} dividido entre el SUV _{max} de la vena cava.
TBR cayado	Cuantitativa continua	Valor de captación SUV _{max} dividido entre el SUV _{max} de la vena cava.
MMP-1	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
MMP-2	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
MMP-7	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
MMP-9	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
MMP-10	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
TIMP-1	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
VSG	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.
PCR	Cuantitativa continua	Valores sanguíneos.

RICORNA	Cuantitativa discreta	Ecuación que tiene en cuenta los principales factores de riesgo vascular.
Estatinas*	Categoría nominal	1= toma de estatinas 0= no hay toma de estatinas.

*La toma de estatinas se incluyó como una variable adicional dada su acción antiinflamatoria en la placa aterosclerótica. VSG: velocidad de sedimentación globular, PCR: proteína C reactiva, RICORNA: RIESGO para eventos CORonarios en la población de Navarra.

El TBR de la arteria carótida contralateral parecía ser un buen predictor de tales eventos (HR = 3,5 p = 0,05), aunque cuando el modelo se asoció con las variables de interés, a saber, RICORNA y MMP-7, el riesgo no fue estadísticamente significativo para el TBR (HR = 2,5 p = ,15). La inclusión de otras variables, como el resto de MMP, TIMP-1, PCR o VSG y ¹⁸F-FDG-PET, no logró mejorar la predicción de eventos vasculares. Se aplicaron veinte imputaciones múltiples para los 8 valores perdidos en la variable MMP-7 y ¹⁸F-FDG-PET. Cuando se utilizó solo RICORNA, el modelo fue predictivo (P = 0,001) y cuando se utilizó MMP-7 y ¹⁸F-FDG-PET, el modelo también fue predictivo (P = 0,019). Esto demuestra el buen comportamiento predictivo de MMP-7 gracias al uso de la imputación múltiple de los datos ausentes. Los niveles de MMP-7 no fueron significativamente diferentes en pacientes con y sin enfermedad coronaria. Cuando se estudiaron las curvas ROC con una regresión logística para la MMP-7, se estableció un punto de corte de 20,48 ng / ml (para una probabilidad de ,4986). Esto se corresponde con un área bajo la curva (AUC) de 0.7115 que indica el poder predictivo de la regresión logística en general (P = 0,0844). Dicho punto de corte llevó a una sensibilidad del 61%, una especificidad del 87%, y un valor predictivo positivo del 80%. Esta probabilidad vino de maximizar la curva ROC (figura 5).

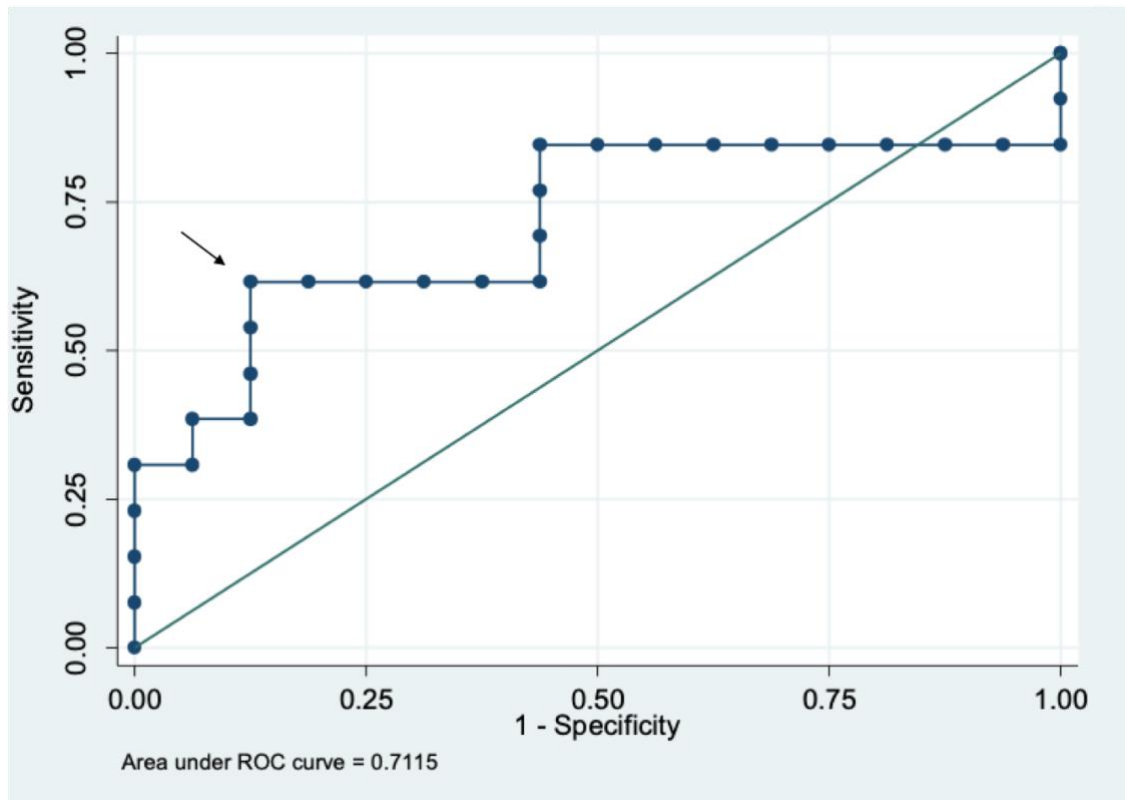


Figura 5. Curva ROC.

El gráfico refleja la sensibilidad y la especificidad: el punto de corte (flecha) tiene buena sensibilidad y especificidad en comparación con el punto de intersección.

5.7 Metaloproteasas en el estudio histológico de las placas y su correlación con los niveles circulantes.

Todas las muestras de endarterectomía correspondían a placas ateroscleróticas avanzadas (tipos V-VIII) según la clasificación histológica de la *American Heart Association* (AHA) (148). La mediana de la escala de clasificación visual semicuantitativa (0-5) para cada inmunotinción de MMP puede verse en la tabla 8. Hubo una asociación significativa entre el CD68 y MMP-9 ($r = 0,42$, $p = 0,009$) o TIMP-1 ($r = 0,38$, $p = ,018$), incluso después de la corrección de Bonferroni, pero no con MMP-10 ($r = 0,28$). En las figuras 6 a 8 pueden observarse algunos ejemplos de inmunotinción. Se encontró una correlación moderada entre los valores de TIMP-1 en plasma e intraplaca ($r = 0,42$; $p = ,02$), pero no hubo asociación entre los valores de MMP-9 o MMP-10 intraplaca y su concentración plasmática. Las correlaciones entre las MMP plasmáticas y los hallazgos histológicos se muestran en la tabla 9. El TIMP-1 intraplaca se correlacionó con su nivel plasmático ($r = 0,42$ $p = 0,02$) y con la captación de ^{18}F -FDG ($r = 0,38$ $p = 0,05$).

Tabla 8. Escala de clasificación visual semicuantitativa (escala de 0 a 5).

Paciente	MMP-9	MMP-10	CD68	TIMP-1
1	4,5	4	4	1
2	2,5	1	0	0
4	3	1	4	4
5	2,5	3,5	3	1
6	3	2	3	1
7	5	4,5	3	0
8	4,5	2,5	5	2
9	0	0	0	0
10	4,5	0,5	4	2
11	5	3,5	2	5
12	0,5	2	0	0
13	2,5	3	3	4
14	2,5	1,5	2	3
15	4	3,5	2	3
16	4	2,5	2	2
17	1,5	2	1	1
18	1,5	2	1	0
19	1	1,5	0	1
20	1,5	1,5	1	0
21	3	2,5	3	5
22	4	2,5	4	5
23	3,5	5	5	1
24	2,5	2,5	3	2
25	2	2,5	2	1
26	1	0	1	1
27	3	3	3	1
28	5	3	4	3
29	4	3	3	2
30	5	4	5	3
31	2	1	2	3

MMP metaloproteasa

CD68 *cluster of differentiation 68*

TIMP inhibidor tisular de metaloproteasas.

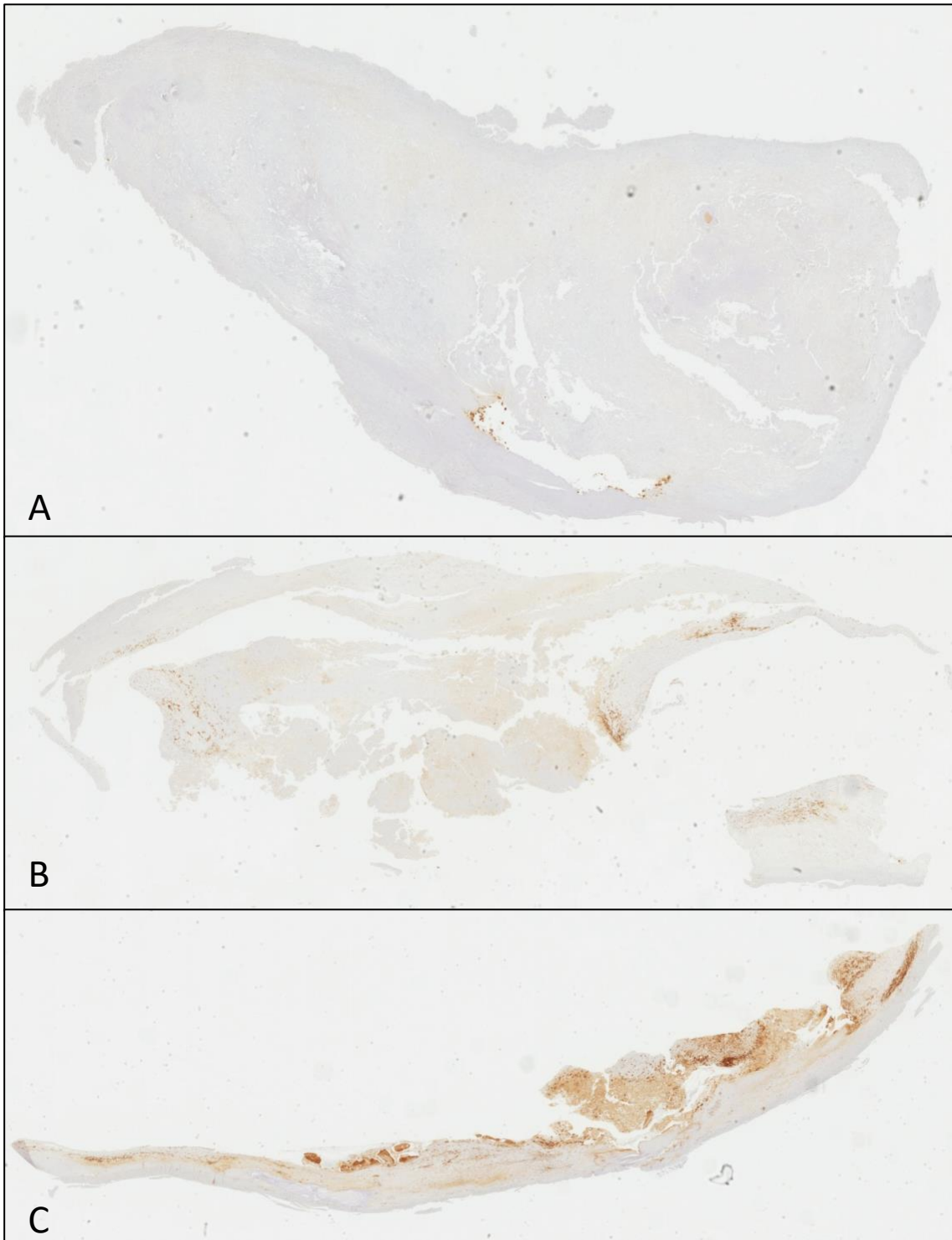


Figura 6

Imagen representativa de A= baja inmunotinción CD68 (1/5); B= media (2/5) y C= alta (4/5).

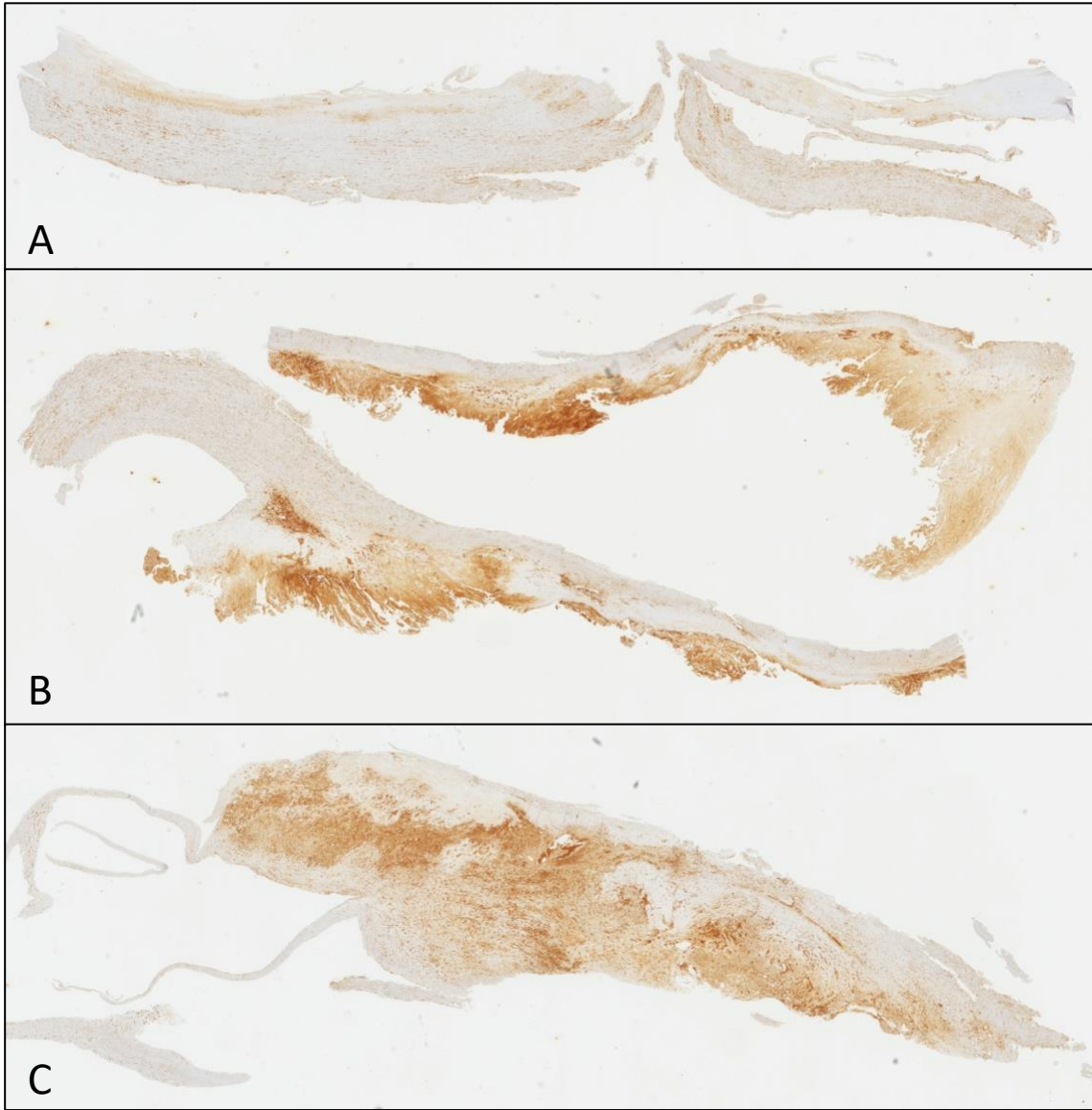


Figura 7

Imagen representativa de A= baja inmunotinción MMP-9 (1/5); B= media (3/5) y C= alta (5/5).

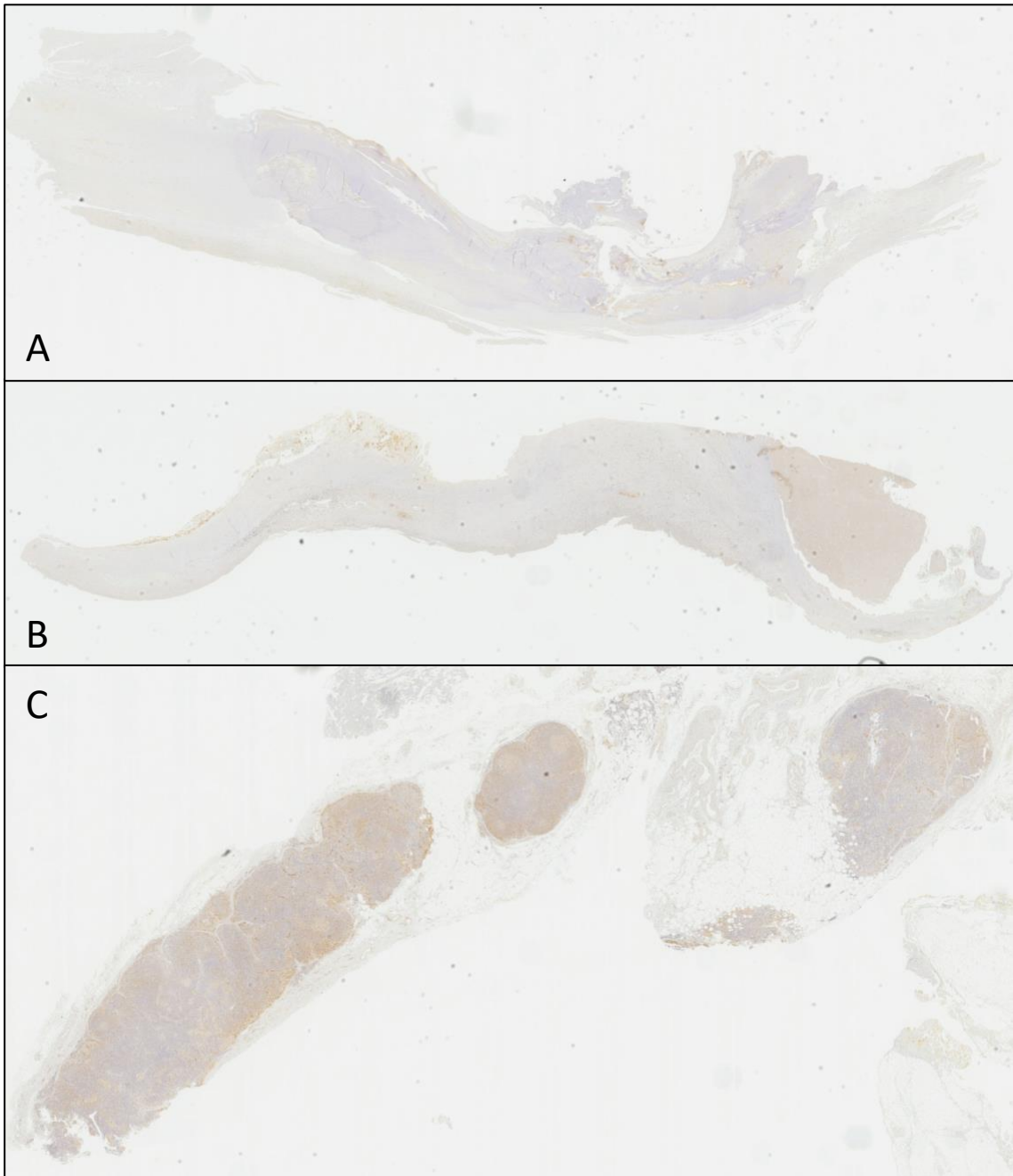


Figura 8

Imagen representativa de A= baja inmunotinción MMP-10 (1/5); B= media (2/5) y C= alta (4/5).

Tabla 9. Correlación entre MMPs plasmáticos y hallazgos histológicos.

Histología	Plasma	Correlación *	P-valor
CD68	MMP-9	r=0,42	0,009
	MMP-10	r=0,28	0,09
	MMP-7	r=0,04	0,83
	TIMP-1	r=0,38	0,018
MMP-10	MMP-10	r=0,14	0,45
MMP-9	MMP-9	r=0,37	0,08
TIMP-1	TIMP-1	r=0,42	0,02

CD68 *cluster of differentiation* 68; MMP metaloproteasa; TIMP inhibidor tisular de metaloproteasas. *En las variables que seguían una distribución normal se utilizó coeficiente de correlación de Pearson mientras que en las que no seguían una distribución normal se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

5. 8. Correlación entre el valor de captación de ¹⁸F-FDG observado en la lesión ateromatosa carotídea con la densidad de células que expresan el marcador macrofágico CD68 en la pieza quirúrgica extraída mediante endarterectomía.

Existe una correlación débil entre CD68 intraplaca (marcador de macrófagos) y ¹⁸F-FDG-PET (r = 0,31), aunque no alcanzó significación estadística (p = 0,12). No se encontró correlación entre CD68 intraplaca y las MMP intraplaca, TIMP-1, y los niveles de hs-CRP o VSG.

DISCUSIÓN

6. Discusión

En el presente estudio no se observó una diferencia significativa entre el grado de inflamación medida por ^{18}F -FDG-PET / CT en la región de máxima estenosis arterial entre los pacientes con estenosis carotídea sintomática y asintomática, con independencia de que, para establecer el grado de inflamación intraplaca, se utilice el SUVmax o el TBR. En estudios previos se había sugerido que el grado de inflamación medido por ^{18}F -FDG-PET / CT permitía diferenciar carótidas sintomáticas y asintomáticas. Así, Demeure y colaboradores (149) compararon el grado de inflamación en 30 pacientes con estenosis carotídea grave (superior al 70%), 11 de ellos sintomáticos y 19 asintomáticos, con un diseño similar al del presente trabajo. Observaron que los valores de TBR fueron mayores en los pacientes sintomáticos que en los asintomáticos ($1,97 \pm 0,28$ versus $1,68 \pm 0,35$; $p = 0,05$). Por otro lado, Rudd y colaboradores (113) estudiaron 8 pacientes con estenosis sintomática mediante ^{18}F -FDG-PET de los cuales 6 mostraron algún grado de estenosis en el lado contralateral y se comparó la captación en la carótida sintomática con la contralateral. El grado de captación en la placa sintomática era un 27% más elevado que el de la estenosis asintomática contralateral. A diferencia del presente estudio, en el que se compararon estenosis superiores al 70% en pacientes sintomáticos y asintomáticos, el grado de estenosis de la carótida asintomática de los 6 pacientes con estenosis bilateral fue de entre el 35% y el 75%. Siguiendo la metodología de Rudd y colaboradores (108), se comparó en esta cohorte de pacientes, el grado de inflamación de las lesiones ateromatosas críticas con la de otras placas asintomáticas existentes en la carótida contralateral de los pacientes y tampoco se detectaron diferencias significativas. La mayoría de los

pacientes de esta cohorte presentaban placas carotídeas en la carótida contralateral a la lesión crítica, aunque estas placas asintomáticas eran mayoritariamente inferiores al 70%. Es posible que el grado de inflamación intraplaca medido mediante ^{18}F -FDG-PET / CT dependa del grado de estenosis arterial lo que explicaría estos resultados. En línea con los hallazgos del presente estudio, otros autores observaron, en 15 pacientes con estenosis carotídea sintomática, que el grado de inflamación era comparable entre las lesiones sintomáticas y asintomáticas (114). En este trabajo, Okane y colaboradores (109) estudiaron la captación en 15 pacientes con estenosis carotídea sintomática reciente y 2 pacientes con infartos crónicos y no identificaron una captación significativa en muchas de las lesiones o diferencias entre sintomáticos y asintomáticos. Finalmente, en el estudio de Skagen y colaboradores (35), comparando dos grupos de 18 pacientes con estenosis sintomática y asintomática se describió una diferencia significativa en los valores de SUV_{max} en favor del grupo sintomático ($P = ,03$) con respecto al asintomático. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas al aplicar el TBR.

La ausencia de diferencias en la captación por ^{18}F -FDG-PET / CT podrían explicarse porque el grado de inflamación dependa de la composición de la placa. De hecho, algunos autores han observado que el grado de inflamación es habitualmente menor en placas calcificadas (150, 151). En el presente estudio las placas eran heterogéneas, pero mayoritariamente muy calcificadas y la captación de FDG en las placas carotídeas no se correspondía con zonas calcificadas en las arterias, tal y como describieron Rudd y colaboradores (132). Idénticas conclusiones se obtuvieron del estudio de Demeure F y colaboradores

(149) que observaron que la captación de ^{18}F -FDG y el número de macrófagos (por tanto, el componente inflamatorio intraplaca) se asociaron de forma inversa con la cantidad de calcio en la placa.

Otro de los objetivos de este trabajo fue establecer si los niveles circulantes de metaloproteasas (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) o de sus inhibidores (TIMP-1) permitían diferenciar a los pacientes con estenosis carotídeas sintomáticas y asintomáticas y pacientes sanos. En la presente cohorte de pacientes no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de MMPs de pacientes sintomáticos y asintomáticos. A diferencia de nuestra serie, algunas publicaciones previas demostraron que los niveles de MMP-9 y TIMP-1, se asociaban con una mayor prevalencia de estenosis carotídea y aterosclerosis subclínica en la arteria carótida interna (152) y que en pacientes con estenosis carotídea existe un desequilibrio entre los niveles de MMP -1, -2, -3 y -9 y TIMP-1 y -2 (153) como reflejo de la vulnerabilidad de la placa de ateroma. Otros estudios observaron que los niveles circulantes de otras MMPs como la MMP-8 están también elevados en pacientes diabéticos con placas sintomáticas o que progresan respecto a aquellos pacientes con placas asintomáticas (154, 155). En relación con la MMP-7, un estudio previo que incluyó 182 pacientes con ateromatosis carotídea, observó que los pacientes con ateromatosis carotídea superior al 50% presentaban niveles plasmáticos de MMP-7 significativamente más elevados en comparación con controles sanos, especialmente en pacientes con síntomas recientes (es decir, en los últimos 2 meses) (82). Sin embargo, en ninguno de los estudios realizados hasta la fecha se compararon los niveles de MMPs o TIMP-1 entre pacientes sintomáticos y asintomáticos con estenosis carotídeas críticas.

Los resultados del presente estudio confirman que los niveles de MMP-1, MMP-7 y MMP-10 son diferentes en pacientes con ateromatosis respecto a controles sanos. Es bien conocido que los niveles circulantes de MMPs o de sus inhibidores (TIMP-1) se alteran en respuesta a la presencia de múltiples factores de riesgo vascular o ateromatosis, aunque sea subclínica (53). Por tanto, nuestros hallazgos sugieren que los niveles de metaloproteasas reflejan la presencia de ateromatosis, con independencia de que las placas sean o no sintomáticas, al igual que describen otros autores (156). La MMP-10 participa en el proceso de remodelado vascular inducido por mediadores inflamatorios (157) y se ha demostrado que un aumento en los niveles de MMP-10 se relaciona con un aumento en la gravedad de la aterosclerosis y un peor pronóstico de la enfermedad arterial periférica (158). Por su parte, la MMP-1 junto con la MMP-8 y la MMP-13 se asocia con un aumento de la degradación del colágeno en la capa fibrosa de la placa ateromatosa que conduce a su ruptura (159). Además, es posible que el aumento de MMP-1, MMP-7 y MMP-10 se deba a la presencia de placas vulnerables en otros territorios arteriales. La aterosclerosis es una enfermedad generalizada y muchos de los pacientes asintomáticos de la presente cohorte, presentaban placas en otros territorios arteriales que podrían condicionar alteraciones de los niveles de metaloproteasas circulantes o sus inhibidores. De hecho, aunque se trató de reclutar pacientes con estenosis carotídeas sin enfermedad vascular activa en otros territorios arteriales, en todos los pacientes incluidos (tanto sintomáticos como asintomáticos) se observaron en el estudio PET placas con un elevado componente inflamatorio, sobre todo en femorales e iliacas.

En este trabajo también se estudió si existía una correlación entre la presencia de inflamación de las placas carotídeas, medidas mediante ^{18}F -FDG-PET / CT y los niveles de metaloproteasas/ inhibidores. Considerando que la inflamación intraplaca y los niveles circulantes de las MMPs y sus inhibidores podrían identificar placas de ateroma vulnerable, se consideró que alguna de las MMPs debería estar elevada en estenosis sintomáticas con actividad inflamatoria. Sin embargo, en nuestra serie de pacientes, no se observó una correlación significativa entre los niveles de MMPs y los valores de captación en la estenosis carotídea medida mediante ^{18}F -FDG-PET. Estos hallazgos están en concordancia con estudios previos (86). Así, Duivenvoorden R y colaboradores (86) observaron que los niveles plasmáticos de PCR de alta sensibilidad, IL-6, selectina sP, selectina sE, ICAM-1, ECAM-1 y MMP-3 y MMP-9 no se correlacionaron con el grado de inflamación de la placa evaluada mediante ^{18}F -FDG / CT a nivel carotídeo o aórtico. En esta misma línea, otros estudios han demostrado que los niveles de marcadores circulantes de inflamación no se correlacionan con la actividad inflamatoria intraplaca (83, (160).

Sin embargo, otros autores observaron que la captación en las placas carotídeas se correlaciona con la expresión de diferentes marcadores de inflamación a nivel local, incluida la MMP-9 intraplaca (132).

Es indudable que la inflamación es un elemento esencial en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y las MMP están involucradas en la desestabilización de la placa de ateroma. Sin embargo, el perfil inflamatorio o los niveles de MMPs y sus inhibidores circulantes no predicen de forma fiable el grado de inflamación de la placa en pacientes con estenosis carotídea. Esta falta de correlación podría explicarse parcialmente por el hecho de que las placas de ateroma presentasen

una alta calcificación, lo cual se correlaciona negativamente con la inflamación medida a través de la FDG-PET (95) o que esta correlación solo pueda observarse a nivel local, en la placa de ateroma.

Paradójicamente, en el presente estudio, el TIMP-1 circulante, se correlacionó de forma débil a moderada con el grado de inflamación medido mediante ¹⁸F-FDG-PET. En pacientes con placas ateroscleróticas vulnerables debería prevalecer la degradación de la matriz, con un aumento de la secreción de MMPs, mientras que los inhibidores como el TIMP-1 deberían estar disminuidos, lo que induciría una mayor actividad proteolítica e incrementaría el riesgo de ruptura de la placa. De hecho, experimentalmente la sobreexpresión de TIMP-1 reduce las lesiones ateroscleróticas y reduce los niveles de MMP-2, MMP-3 y MMP-13 (161). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los niveles elevados de TIMP-1 se asocian con mayor riesgo vascular o de eventos de origen cardiaco. En el Framingham Heart Study se observó que los niveles plasmáticos de TIMP-1 son más altos en hombres que en mujeres y se correlacionaron con los principales factores de riesgo vascular, los índices de hipertrofia del ventrículo izquierdo y disfunción sistólica (162). En esta misma línea, en pacientes con lesiones coronarias, los niveles circulantes de TIMP-1, pero no los de MMP-9 se asocian con mayor riesgo de muerte de origen cardiaco, infarto de miocardio y revascularización de la lesión diana (163). En este trabajo, la ausencia de correlación de las MMPs circulantes estudiadas con la captación de FDG en la placa sugieren que el TIMP-1 puede tener efectos que van más allá de sus acciones sobre las MMPs. Por otro lado, Orbe et al (164) demostraron que las áreas de calcificación en las placas ateroscleróticas se asociaban con un aumento de la expresión de TIMP-1. Es posible que la

correlación observada no esté reflejando la inflamación intraplaca, sino que se relaciona con la composición de las placas que en este estudio mayoritariamente son calcificadas.

Una cuestión interesante que se planteó al inicio de este estudio fue conocer si los niveles de metaloproteasas/inhibidores predecían la aparición de nuevos eventos isquémicos a lo largo del seguimiento. En este sentido, unos de los resultados más interesantes del presente estudio es que el nivel de MMP-7 circulante, demostró ser capaz de predecir eventos vasculares después de un seguimiento de 1004 días, mejorando la capacidad predictiva de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Este hallazgo novedoso es consistente con los datos de un estudio previo (82) en el que los niveles plasmáticos elevados de MMP-7 se asociaron de forma independiente con la mortalidad total después de un seguimiento medio de 3,5 años. En contraste con el presente trabajo, Abbas y colaboradores (82) no documentaron una asociación de la MMP-7 con la aparición de eventos cardiovasculares (82). Los mecanismos subyacentes a la asociación entre MMP-7 y eventos cardiovasculares recurrentes aún no se han definido. No obstante, parece razonable pensar que el aumento de MMP-7 pueda estar involucrado en la progresión de la placa ateromatosa. Así, en un estudio previo que incluyó 106 endarterectomías, se demostró que la sobreexpresión del gen MMP-7 era 100 veces mayor en las placas que en las arterias normales (165). Otra posible explicación es que la MMP-7 podría aumentar la vulnerabilidad de la placa a través de procesos inflamatorios (86, 156). Sin embargo, en el presente estudio no encontramos ninguna correlación entre la MMP-7 circulante y la inflamación de la placa carotídea in vivo evaluada mediante ^{18}F -FDG-PET/CT. Podría sugerirse que en la PET/TC con ^{18}F -FDG

puede ser menos sensible que la histología para la detección de inflamación lo que explicaría la ausencia de correlación. También se podría hipotetizar que son los niveles de MMPs intraplaca los que podrían correlacionarse con el grado de inflamación. Sin embargo, tampoco se encontró una correlación entre el grado de inflamación de la placa en PET / TC con ^{18}F -FDG y las MMP que se determinaron intraplaca. En este estudio, no se midió la MMP-7 intraplaca y, por lo tanto, no se puede saber con certeza si la inflamación intraplaca es un reflejo de los niveles locales de MMP-7. Finalmente, es posible que la elevación de los niveles plasmáticos de MMP-7 refleje la carga aterosclerótica del paciente, pero no informe sobre la presencia de inflamación de la placa en un territorio vascular específico.

A diferencia de lo observado con la MMP-7, en el presente estudio el grado de inflamación en la placa carotídea medido mediante ^{18}F -FDG-PET / TC no permitió predecir el riesgo de ictus o eventos vasculares después de un seguimiento de 1004 días. Estos resultados contrastan con lo publicado previamente por Kelly y colaboradores (133) que encontraron que los valores de SUV_{max} se asociaron con un HR de 4,57 (IC 1,5-13,96; $p=0,008$) tras un seguimiento de 90 días. No obstante, la alta incidencia de ictus en dicho estudio (37 de 192 pacientes) pudo favorecer la obtención de hallazgos significativos. Por otra parte, y a diferencia del presente estudio, en la publicación de Kelly y colaboradores (133) las placas de ateroma no eran mayoritariamente calcificadas. En nuestra cohorte se observó que la mayoría de los pacientes presentaban placas calcificadas y que la presencia de calcio intraplaca se correlacionaba negativamente con la captación del radiotrazador FDG.

La composición de la placa es uno de los factores que podría condicionar la presencia de inflamación intraplaca. En este trabajo, se observó una correlación no significativa entre el valor de captación de ^{18}F -FDG-PET / CT observado en la lesión ateromatosa carotídea con la densidad de células que expresan el marcador macrofágico CD68 en la pieza quirúrgica extraída mediante endarterectomía. A diferencia del presente estudio, Rudd y colaboradores (108) demostraron que existía una buena correlación entre la inflamación medida mediante FDG-PET y la expresión de CD68 intraplaca (113). No obstante, al igual que en nuestra cohorte, otros autores no han encontrado una correlación entre la composición de la placa y la captación de FDG (36, 121). Aunque es posible que nuestros hallazgos no alcancen la significación estadística por falta de potencia, algunos investigadores apuntan a que el FDG-PET podría medir otros fenómenos más allá de la inflamación como la neoangiogénesis (122) y la hipoxia a nivel local (123).

Como se ha comentado previamente, la composición de la placa podría explicar la presencia de captación en PET y es menor en placas de ateroma calcificadas, como ocurre en la mayoría de sujetos de este estudio. En concordancia con nuestros hallazgos, el mayor estudio hasta la fecha que evaluó la presencia de inflamación vascular mediante ^{18}F -FDG-PET / MRI en individuos con ateromatosis, mostró que la mayoría de las captaciones de FDG se detectaron en segmentos arteriales libres de calcio, así como en placas ricas en lípidos, lo que sugiere que la inflamación arterial es más activa en etapas tempranas de la aterosclerosis (138).

Los pacientes con estenosis carotídea grave tienen un mayor riesgo de ictus, enfermedad de la sustancia blanca (166), enfermedad de las arterias coronarias

(167), arteriopatía periférica y muerte de origen vascular (168). El neurólogo clínico tiene un especial interés en conocer el riesgo de ictus en pacientes con estenosis carotídea. En la actualidad, no existe un biomarcador que permita predecir el riesgo de ictus o eventos vasculares en pacientes con estenosis carotídea. Nuestros hallazgos sugieren que, en pacientes con estenosis carotídea crítica, el aumento de MMP-7 circulante podrían utilizarse como un biomarcador de riesgo de eventos vasculares, aunque puede incrementarse en otras enfermedades (160), pero no es un marcador específico de riesgo de ictus o de recurrencia de ictus isquémico. La elevación de MMP-7 probablemente refleja la carga aterosclerótica de los pacientes, pero no el riesgo de complicaciones de la placa carotídea sintomática o asintomática. No en vano, la MMP-7 se ha utilizado en paneles de proteómica tanto para prevención primaria (169) como secundaria (170) de eventos cardiovasculares. El estudio simultáneo de la expresión de varias proteínas implicadas en el riesgo cardiovascular ha demostrado utilidad en un estudio reciente. Nurmohamed y colaboradores testaron un modelo de 50 proteínas plasmáticas en 870 participantes que ya habían padecido un evento vascular. El mismo panel se testó en una cohorte de validación que incluía 700 pacientes similares. En la primera cohorte, 263 pacientes (30,2%), presentaron un nuevo evento cardiovascular en un periodo con una mediana de seguimiento de 8 años (4,6-12,2 años) incluyendo ictus isquémico (12,1%) infarto de miocardio (5,5%) y muerte de origen vascular (12,6%). En la segunda cohorte, con una mediana de seguimiento de 3 años (2,2-3,1 años), un 7,5% de los pacientes sufrieron un ictus isquémico, un 5,6% un infarto de miocardio y un 5,4% una muerte de origen vascular. El estudio proteómico mejoró el modelo clínico de factores de riesgo vascular clásicos tanto

en la primera (AUC = 0,810 vs. 0,750; $P = 0,001$) como en la segunda cohorte (AUC = 0,801 vs. 0,765; $P = 0,001$). De las 50 proteínas representadas en el modelo, la MMP-7 fue la tercera en importancia solo por detrás del *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide* (NT-proBNP) y la *kidney injury molecule 1* (KIM-1) (171). Estos datos avalan nuestros hallazgos y están en línea con el potencial valor de la MMP-7 como biomarcador.

Hasta la fecha, se han estudiado otros mediadores para predecir el riesgo de ictus isquémico recurrente. Uno de los trabajos más relevantes evaluó 14 biomarcadores diferentes (172), incluida la IL-6 y la proteína C reactiva. Que mostraron una utilidad limitada en la predicción de ictus recurrente. La osteopontina, la neopterinina y la mieloperoxidasa (173), así como la fosfolipasa A2 asociada a las lipoproteínas (174), los niveles de ácidos grasos libres (175) niveles elevados de la lipoproteína A (176) y las células madre endoteliales circulantes (177), podrían predecir el riesgo de recurrencia, mientras que los datos sobre el ligando CD40 soluble son inconsistentes (173, 178). No obstante, ninguno de estos marcadores se ha comparado con MMP-7 en un entorno similar y, por lo tanto, son necesarios más estudios con muestras más amplias.

En esta cohorte de pacientes el estudio PET se amplió para detectar la presencia de placas en arterias de miembros inferiores y se detectaron placas con actividad inflamatoria en PET en las arterias ilíacas en un 100% de los pacientes, en ausencia de sintomatología clínica de arteriopatía periférica. Se observó una correlación fuerte ($r=0,63$) entre el SUV_{max} hallado en carótidas y en arterias ilíacas. En concordancia con estas observaciones, otros autores (35) también han descrito aumento de captación SUV_{max} y TBR en arterias localizadas en

otros territorios vasculares en pacientes con estenosis carotídea grave. En concordancia con estos resultados, otros autores observaron que en pacientes con estenosis carotídea se detecta enfermedad coronaria y arteriopatía periférica en el 68% y 21% de los pacientes, respectivamente (179). Además, el riesgo de presentar enfermedad vascular en otros lechos vasculares es mayor entre los pacientes con estenosis carotídea crítica. La alta probabilidad de detectar ateromatosis en otros territorios, unido a la elevada frecuencia de complicaciones relacionadas con la enfermedad arterial periférica a lo largo del seguimiento observada en este estudio, sugiere que los neurólogos deberíamos considerar la ateromatosis carotídea crítica como un indicador de que el paciente padezca enfermedad polivascular y realizar una evaluación más exhaustiva de la presencia de ateromatosis en otros territorios arteriales. De hecho, el riesgo de eventos vasculares es más elevado en pacientes con enfermedad de dos o más territorios arteriales. El estudio REACH demostró un aumento acumulativo de casi tres veces del riesgo de muerte cardiovascular, infarto de miocardio o ictus en pacientes con enfermedad ateromatosa de más de un territorio vascular en comparación con pacientes con solo factores de riesgo de aterotrombosis (180), que se confirmó en estudios posteriores (181, 182). En este trabajo se detectaron además placas asintomáticas en no solo en arterias ilíacas y femorales sino también en la aorta, como expresión de que la enfermedad ateromatosa es generalizada

La enfermedad carotídea también es más frecuente en los pacientes con enfermedad arterial periférica, y existe una relación entre la gravedad de la enfermedad arterial periférica y la ateromatosis carotídea (183, 184).

El estudio tiene una serie de fortalezas que deben ser destacadas. En primer lugar, se realizó una selección cuidadosa de los pacientes, los datos demográficos, clínicos y resultados de pruebas diagnósticas eran detallados y estaban disponibles para todos los pacientes durante todo el seguimiento y tratamiento, el cual se realizó siguiendo estrictamente las últimas guías clínicas en todos los casos. Se excluyeron aquellos pacientes con enfermedades infecciosas, autoinmunes o inmunosupresión, con antecedentes de enfermedad vascular, eventos isquémicos cardíacos y cirugías recientes o que recibieran tratamientos que pudieran alterar la medición de metaloproteasas o el componente inflamatorio de la placa. Además, se realizó en todos los pacientes un ^{18}F -FDG-PET/TC en las primeras dos semanas y en ningún caso se retrasó la cirugía para realizar esta exploración. En tercer lugar, el grado de inflamación de la placa carotídea se midió de forma detallada y en todos los pacientes se realizó un seguimiento prolongado, sin que haya habido pacientes perdidos. Finalmente, todas las muestras se recogieron y almacenaron siguiendo los estrictos criterios de calidad del Biobanco de la Universidad de Navarra y las mediciones de metaloproteasas se realizaron en un laboratorio con amplia experiencia.

La principal limitación del estudio es el bajo número de pacientes. Un mayor número de pacientes podría haber identificado diferencias en los niveles de MMP-7 entre pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como la utilidad de otros biomarcadores potenciales. De hecho, la consiguiente falta de poder estadístico puede haber impedido observar el valor predictivo de la ^{18}F -FDG-PET en la predicción de eventos vasculares. Los estrictos criterios de inclusión y la necesidad de realizar un ^{18}F -FDG-PET antes de 2 semanas desde el inicio de los síntomas han sido los principales factores limitantes del reclutamiento de

pacientes. Además, se ha observado un aumento del número creciente de pacientes con estenosis carotídea grave tratados con stenting. Diferentes estudios han mostrado que la colocación de endoprótesis para la estenosis carotídea sintomática se asocia con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular periprocedimiento o muerte que la endarterectomía (185). Sin embargo, este riesgo adicional se atribuye principalmente a un aumento de ictus leves no discapacitantes que ocurren en personas mayores de 70 años y a largo plazo la colocación de un stent carotídeo es tan eficaz para prevenir la recurrencia de ictus como la endarterectomía. Por este motivo, el número de carótidas sintomáticas tratadas con stenting en pacientes menores de 70 años experimentó un aumento significativo, que también influyó en el reclutamiento de pacientes sometidos a endarterectomía. Por otro lado, es posible que la actividad inflamatoria de la placa de ateroma en PET esté influida por el uso de estatinas en los pacientes del presente estudio. El uso de estatinas a altas dosis en pacientes con estenosis carotídea se realizó en todos los pacientes antes del realizar la PET, siguiendo las guías clínicas vigentes para el tratamiento del ictus. Por cuestiones éticas no se retrasó el inicio de ningún tratamiento que estuviera indicado a criterio médico antes de la realización del ^{18}F -FDG-PET. Es necesario tener en cuenta que la resolución espacial de los estudios PET es limitada y puede que en el estudio histológico de la placa no se haya incluido la zona en la que se detecta inflamación en el PET. En este estudio no se incluyeron pacientes con estenosis menores del 70% porque se quería estudiar la histología de la placa. Es posible que incluyendo lesiones menos avanzadas se hubiera obtenido placas con menor grado de calcificación y con más componente inflamatorio. Además, no se obtuvieron imágenes de la placa aterosclerótica mediante una

modalidad de imágenes de alta resolución como la resonancia magnética que podría haber permitido identificar mejor los componentes histológicos de la placa y su vulnerabilidad. Otra posible limitación es que la extensa descalcificación requerida para el análisis de las muestras de endarterectomía podría haber afectado negativamente a la antigenicidad tisular, particularmente la de las proteínas extracelulares como las MMP. Finalmente, la enfermedad arterial periférica es común en pacientes con estenosis carotídea y no se estudió la presencia de enfermedad arterial periférica subclínica mediante índice tobillo-brazo, ecografía, TC o RM antes de la endarterectomía. Aunque nuestros pacientes no presentaban síntomas de claudicación intermitente, no se puede descartar por completo la presencia de estenosis de arterias femorales graves, aunque sin síntomas clínicos, previa a la endarterectomía.

En conclusión, en la mayoría de los casos, el ictus isquémico aterotrombótico está causado por la desestabilización de una placa aterosclerótica vulnerable. En comparación con las lesiones estables, las placas vulnerables suelen presentar inflamación y por este motivo la identificación de las placas ateroscleróticas en riesgo de ruptura constituiría un avance importante en el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica. Los hallazgos del presente estudio no apoyan el uso de ^{18}F -FDG-PET / CT o los niveles de metaloproteasas o sus inhibidores para diferenciar estenosis carotídeas sintomáticas o asintomáticas y tampoco para establecer el riesgo de recurrencia de ictus. Nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que la MMP-7 circulante podría representar un biomarcador de eventos cardiovasculares recurrentes (no específicamente de ictus) en pacientes con estenosis carotídea grave.

La aterosclerosis es una enfermedad muy compleja en el que la predicción de riesgos supone un desafío para el clínico. Es probable que el análisis combinado de diferentes variables que obligatoriamente incluyan el grado de estenosis, las características histológicas de la placa y su actividad inflamatoria permitan identificar con mayor precisión los pacientes con riesgo de complicaciones vasculares.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

1. En pacientes con estenosis carotídea crítica, el grado de inflamación de las placas medidas mediante ^{18}F -FDG-PET / CT, no permite discriminar entre estenosis carotídeas sintomáticas y asintomáticas.
2. Los niveles circulantes de MMP-1, MMP-7 y MMP-10 se elevan en pacientes con estenosis crítica de carótida sintomática y asintomática, en comparación con controles sanos, como reflejo de la actividad inflamatoria de la aterosclerosis.
3. Los niveles circulantes de MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, y TIMP-1 no reflejan el grado de inflamación medido mediante ^{18}F -FDG-PET / CT en la estenosis carotídea crítica.
4. En pacientes con estenosis carotídea crítica, los niveles de MMP-7 circulante permiten predecir el riesgo de eventos vasculares a lo largo del seguimiento y la medición de MMP-7 podría utilizarse como biomarcador con significado pronóstico.
5. Los niveles de MMP-9, MMP-10 medidos en la placa de ateroma no reflejan los niveles circulantes de estas MMPs o el grado de inflamación intraplaca medido mediante ^{18}F -FDG-PET / CT.
6. Los niveles de TIMP-1 intraplaca se correlacionaron con los niveles circulantes y con el grado de inflamación intraplaca medido mediante ^{18}F -FDG-PET / CT.
7. El marcador macrofágico CD68 medido en la placa de ateroma no se correlacionó con el grado de inflamación intraplaca medido mediante ^{18}F -FDG-PET / CT.

REFERENCIAS

1. Sanidad Md. Patrones de mortalidad 2017. Disponible en:
https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/Patrones_Mortalidad_2017.pdf.
2. Irimia Sieira O, Esparragosa I, Valentí R, Martínez-Vila E. Enfermedades cerebrovasculares. Hemorragia cerebral. *Medicine*. 2018;12(70):4075-84.
3. Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. *Bull World Health Organ*. 1980;58(1):113-30.
4. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, et al. Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Engl J Med*. 2002;347(21):1713-6.
5. Díaz-Guzmán J, Egido JA, Gabriel-Sánchez R, Barberá-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C, et al. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34(4):272-81.
6. Boix R, del Barrio JL, Saz P, Reñé R, Manubens JM, Lobo A, et al. Stroke prevalence among the Spanish elderly: an analysis based on screening surveys. *BMC Neurol*. 2006;6:36.
7. Atlas del ictus en España 2019. Disponible en:
[https://www.sen.es/images/2020/atlas/Atlas del Ictus de Espana version web.pdf](https://www.sen.es/images/2020/atlas/Atlas_del_Ictus_de_Espana_version_web.pdf).
8. Collaborators GS. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18(5):439-58.
9. Hankey GJ. Long-term outcome after ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *Cerebrovasc Dis*. 2003;16 Suppl 1:14-9.
10. Touzé E, Varenne O, Chatellier G, Peyrard S, Rothwell PM, Mas JL. Risk of myocardial infarction and vascular death after transient ischemic attack and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2005;36(12):2748-55.
11. Rajsic S, Gothe H, Borba HH, Sroczyński G, Vujicic J, Toell T, et al. Economic burden of stroke: a systematic review on post-stroke care. *Eur J Health Econ*. 2019;20(1):107-34.
12. Epidemiología de los subtipos de ictus en pacientes hospitalizados atendidos por neurólogos: resultados del registro EPICES (I) REV NEUROL 2012;54:385-393; The Mataró Stroke Registry: A 10-year registry in a community hospital. *Neurología (English Edition) Volume 30, Issue 5, June 2015, Pages 283-289*.
13. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Alvarez-Sabín J en nombre del Comité de Redacción ad hoc del Grupo de estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Ictus. Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurología* 2002; 17: 3-12.
14. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet*. 2016;388(10046):761-75.
15. Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW, D'Agostino R, Ohman EM, Röther J, et al. One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA*. 2007;297(11):1197-206.
16. Gutierrez JA, Aday AW, Patel MR, Jones WS. Polyvascular Disease: Reappraisal of the Current Clinical Landscape. *Circ Cardiovasc Interv*. 2019;12(12):e007385.
17. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91(1):327-87.
18. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. Braunwald's Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine. 10th Ed 2015; Philadelphia: Elsevier Saunders
19. Loeb, O., Ueber experimentelle Arterienveränderungen mit besonderer Berücksichtigung der Wirkung der Milchsure auf Grundeigene Versuche, *Deutsch. reed. Wchnschr.*, 1913, xxxix, I819.
20. Adler I. FURTHER STUDIES IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS. *J Exp Med*. 1917;26(4):581-602.
21. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 Suppl):C7-12.
22. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, et al. Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(1):122-31.
23. Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(3):209-15.
24. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des*. 2005;11(23):3061-72.
25. Páramo JA, Orbe J, Rodríguez JA. [Atheroma plaque stabilization: a new concept based on the dynamic biology of atherosclerosis]. *Med Clin (Barc)*. 2003;121(15):583-7.
26. Rudd JH, Davies JR, Weissberg PL. Imaging of atherosclerosis -- can we predict plaque rupture? *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(1):17-24.

27. Tomey MI, Narula J, Kovacic JC. Advances in the understanding of plaque composition and treatment options: year in review. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(16):1604-16.
28. Grotta JC. Carotid stenosis. *N Engl J Med.* 2013;369(24):2360-1.
29. Pessin MS, Hinton RC, Davis KR, Duncan GW, Roberson GH, Ackerman RH, et al. Mechanisms of acute carotid stroke. *Ann Neurol.* 1979;6(3):245-52.
30. Bogousslavsky J, Pierre P. Ischemic stroke in patients under age 45. *Neurol Clin.* 1992;10(1):113-24.
31. Touzé E, Southerland AM, Boulanger M, Labeyrie PE, Azizi M, Bouatia-Naji N, et al. Fibromuscular Dysplasia and Its Neurologic Manifestations: A Systematic Review. *JAMA Neurol.* 2019;76(2):217-26.
32. Howard DP, van Lammeren GW, Rothwell PM, Redgrave JN, Moll FL, de Vries JP, et al. Symptomatic carotid atherosclerotic disease: correlations between plaque composition and ipsilateral stroke risk. *Stroke.* 2015;46(1):182-9.
33. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation.* 2003;108(14):1664-72.
34. Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery plaque: current imaging methods and new perspectives. *Stroke.* 2005;36(12):2764-72.
35. Skagen K, Johnsrud K, Evensen K, Scott H, Krohg-Sørensen K, Reier-Nilsen F, et al. Carotid plaque inflammation assessed with (18)F-FDG PET/CT is higher in symptomatic compared with asymptomatic patients. *Int J Stroke.* 2015;10(5):730-6.
36. Johnsrud K, Skagen K, Seierstad T, Skjelland M, Russell D, Revheim ME. F-FDG PET/CT for the quantification of inflammation in large carotid artery plaques. *J Nucl Cardiol.* 2019;26(3):883-93.
37. Autret A, Pourcelot L, Saudeau D, Marchal C, Bertrand P, de Boissvilliers S. Stroke risk in patients with carotid stenosis. *Lancet.* 1987;1(8538):888-90.
38. Meissner I, Wiebers DO, Whisnant JP, O'Fallon WM. The natural history of asymptomatic carotid artery occlusive lesions. *JAMA.* 1987;258(19):2704-7.
39. Hertzner NR, Flanagan RA, Beven EG, O'Hara PJ. Surgical versus nonoperative treatment of asymptomatic carotid stenosis. 290 patients documented by intravenous angiography. *Ann Surg.* 1986;204(2):163-71.
40. Spence JD, Azarpazhooh MR, Larsson SC, Bogiatzi C, Hankey GJ. Stroke Prevention in Older Adults: Recent Advances. *Stroke.* 2020;51(12):3770-7.
41. AbuRahma AF, Avgerinos ED, Chang RW, Darling RC, Duncan AA, Forbes TL, et al. Society for Vascular Surgery clinical practice guidelines for management of extracranial cerebrovascular disease. *J Vasc Surg.* 2022;75(1S):4S-22S.
42. Bonati LH, Gregson J, Dobson J, McCabe DJH, Nederkoorn PJ, van der Worp HB, et al. Restenosis and risk of stroke after stenting or endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in the International Carotid Stenting Study (ICSS): secondary analysis of a randomised trial. *Lancet Neurol.* 2018;17(7):587-96.
43. Fisher M, Martin A, Cosgrove M, Norris JW. The NASCET-ACAS plaque project. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *Stroke.* 1993;24(12 Suppl):I24-5; discussion I31-2.
44. Streifler JY, den Hartog AG, Pan S, Pan H, Bulbulia R, Thomas DJ, et al. Ten-year risk of stroke in patients with previous cerebral infarction and the impact of carotid surgery in the Asymptomatic Carotid Surgery Trial. *Int J Stroke.* 2016;11(9):1020-7.
45. Choi JC, Johnston SC, Kim AS. Early outcomes after carotid artery stenting compared with endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *Stroke.* 2015;46(1):120-5.
46. Halliday A, Bulbulia R, Bonati LH, Chester J, Craddock-Bamford A, Peto R, et al. Second asymptomatic carotid surgery trial (ACST-2): a randomised comparison of carotid artery stenting versus carotid endarterectomy. *Lancet.* 2021;398(10305):1065-73.
47. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med.* 1998;339(20):1415-25.
48. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet.* 1998;351(9113):1379-87.
49. Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F, Weiss DG, Messina L, Hershey LA, et al. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in symptomatic carotid stenosis. Veterans Affairs Cooperative Studies Program 309 Trialist Group. *JAMA.* 1991;266(23):3289-94.

50. Chen X, Su J, Wang G, Zhao H, Zhang S, Liu T, et al. Safety and Efficacy of Early Carotid Endarterectomy in Patients with Symptomatic Carotid Artery Stenosis: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6623426.
51. Featherstone RL, Dobson J, Ederle J, Doig D, Bonati LH, Morris S, et al. Carotid artery stenting compared with endarterectomy in patients with symptomatic carotid stenosis (International Carotid Stenting Study): a randomised controlled trial with cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess.* 2016;20(20):1-94.
52. Rosenfield K, Matsumura JS, Chaturvedi S, Riles T, Ansel GM, Metzger DC, et al. Randomized Trial of Stent versus Surgery for Asymptomatic Carotid Stenosis. *N Engl J Med.* 2016;374(11):1011-20.
53. Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. [Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes]. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60(9):959-67.
54. Przemyslaw L, Boguslaw HA, Elzbieta S, Malgorzata SM. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. *BMB Rep.* 2013;46(3):139-50.
55. Noël A, Gutiérrez-Fernández A, Sounni NE, Behrendt N, Maquoi E, Lund IK, et al. New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol.* 2012;3:140.
56. Roose E, Joly BS. Current and Future Perspectives on ADAMTS13 and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hamostaseologie.* 2020;40(3):322-36.
57. Sweeney JM, Barouqa M, Krause GJ, Gonzalez-Lugo JD, Rahman S, Gil MR. Low ADAMTS13 Activity Correlates with Increased Mortality in COVID-19 Patients. *TH Open.* 2021;5(1):e89-e103.
58. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells.* 2020;9(5).
59. Paramo JA, Montero I, Rodríguez JA, Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiológicas y terapéuticas. *Clin Invest Arterioscl.* 2005;17:133-141.
60. Eckhard U, Huesgen PF, Schilling O, Bellac CL, Butler GS, Cox JH, et al. Active site specificity profiling of the matrix metalloproteinase family: Proteomic identification of 4300 cleavage sites by nine MMPs explored with structural and synthetic peptide cleavage analyses. *Matrix Biol.* 2016;49:37-60.
61. Radisky ES, Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Radisky DC. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. *J Cell Biochem.* 2017;118(11):3531-48.
62. Singh D, Srivastava SK, Chaudhuri TK, Upadhyay G. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). *Front Mol Biosci.* 2015;2:19.
63. Behl T, Kaur G, Sehgal A, Bhardwaj S, Singh S, Buhas C, et al. Multifaceted Role of Matrix Metalloproteinases in Neurodegenerative Diseases: Pathophysiological and Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3).
64. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(5):585-600.
65. Azevedo A, Prado AF, Antonio RC, Issa JP, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014;115(4):301-14.
66. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
67. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52-67.
68. Shogan BD, Belogortseva N, Luong PM, Zaborin A, Lax S, Bethel C, et al. Collagen degradation and MMP9 activation by *Enterococcus faecalis* contribute to intestinal anastomotic leak. *Sci Transl Med.* 2015;7(286):286ra68.
69. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, et al. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation.* 1995;92(6):1393-8.
70. Baker J, Falconer AMD, Wilkinson DJ, Europe-Finner GN, Litherland GJ, Rowan AD. Protein kinase D3 modulates MMP1 and MMP13 expression in human chondrocytes. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195864.
71. Konopka JA, DeBaun MR, Chang W, Dragoo JL. The Intracellular Effect of Relaxin on Female Anterior Cruciate Ligament Cells. *Am J Sports Med.* 2016;44(9):2384-92.
72. Nukuda A, Sasaki C, Ishihara S, Mizutani T, Nakamura K, Ayabe T, et al. Stiff substrates increase YAP-signaling-mediated matrix metalloproteinase-7 expression. *Oncogenesis.* 2015;4:e165.
73. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry.* 1991;30(33):8097-102.

74. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Greene KA, Sankaran B, Downey GP, Radisky DC, Radisky ES. Directed evolution of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1 reveals that its N- and C-terminal domains cooperate in matrix metalloproteinase recognition. *J Biol Chem.* 2019;294(24):9476-88.
75. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7414-9.
76. Ågren MS, Schnabel R, Christensen LH, Mirastschijski U. Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 *ex vivo*. *Eur J Cell Biol.* 2015;94(1):12-21.
77. Belton M, Brilha S, Manavaki R, Mauri F, Nijran K, Hong YT, et al. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. *Thorax.* 2016;71(12):1145-53.
78. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.* 2012;18(26):3831-52.
79. Li YF, Xu XB, Chen XH, Wei G, He B, Wang JD. The nuclear factor- κ B pathway is involved in matrix metalloproteinase-9 expression in RU486-induced endometrium breakdown in mice. *Hum Reprod.* 2012;27(7):2096-106.
80. Jang B, Jung H, Choi S, Lee YH, Lee ST, Oh ES. Syndecan-2 cytoplasmic domain up-regulates matrix metalloproteinase-7 expression via the protein kinase C γ -mediated FAK/ERK signaling pathway in colon cancer. *J Biol Chem.* 2017;292(39):16321-32.
81. Castillo J, Alvarez-Sabín J, Martínez-Vila E, Montaner J, Sobrino T, Vivancos J, et al. Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J Neurol.* 2009;256(2):217-24.
82. Abbas A AP, Russell D, Krohg-Sørensen K, Almås T, Bundgaard D, Bjerkeli V, Sagen EL, Michelsen AE, Dahl TB, Holm S, Ueland T, Skjelland M, Halvorsen B. Matrix metalloproteinase 7 is associated with symptomatic lesions and adverse events in patients with carotid atherosclerosis. *PLoS One.* 2014;9:e84935.
83. Noruzzadeh R, Modabbernia A, Aghamollai V, Ghaffarpour M, Harirchian MH, Salahi S, et al. Memantine for Prophylactic Treatment of Migraine Without Aura: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Headache: The Journal of Head and Face Pain.* 2016;56(1):95-103.
84. Visse R NH. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-39.
85. Hansson J VR, Årnlöv J, Ingelsson E, Lind L, Larsson A, Michaëlsson K, Sundström J. Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: cohort study. *PLoS ONE.* 2011;6:e16185.
86. Duivenvoorden R MV, Woodward M, Kallend D, Suchankova G, Fuster V, Rudd JHF, Tawakol A, Farkouh ME, Fayad ZA. Relationship of serum inflammatory biomarkers with plaque inflammation assessed by FDG PET/CT: the dal-PLAQUE study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2013;6:1087-94.
87. Mahdessian H, Perisic Matic L, Lengquist M, Gertow K, Sennblad B, Baldassarre D, et al. Integrative studies implicate matrix metalloproteinase-12 as a culprit gene for large-artery atherosclerotic stroke. *J Intern Med.* 2017;282(5):429-44.
88. Amin M, Pushpakumar S, Muradashvili N, Kundu S, Tyagi SC, Sen U. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2016;21:89-118.
89. Berg G, Miksztowicz V, Schreier L. Metalloproteinases in metabolic syndrome. *Clin Chim Acta.* 2011;412(19-20):1731-9.
90. Provenzano M, Andreucci M, Garofalo C, Faga T, Michael A, Ielapi N, et al. The Association of Matrix Metalloproteinases with Chronic Kidney Disease and Peripheral Vascular Disease: A Light at the End of the Tunnel? *Biomolecules.* 2020;10(1).
91. Arreguin-Cano JA, Ayerdi-Nájera B, Tacuba-Saavedra A, Navarro-Tito N, Dávalos-Martínez A, Emigdio-Vargas A, et al. MMP-2 salivary activity in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetol Metab Syndr.* 2019;11:113.
92. Park JY, Park JH, Jang W, Hwang IK, Kim IJ, Kim HJ, et al. Apolipoprotein A-IV is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *J Biochem.* 2012;151(3):291-8.
93. Cuvelliez M, Vandewalle V, Brunin M, Beseme O, Hulot A, de Groote P, et al. Circulating proteomic signature of early death in heart failure patients with reduced ejection fraction. *Sci Rep.* 2019;9(1):19202.
94. Wu YW, Kao HL, Chen MF, Lee BC, Tseng WY, Jeng JS, et al. Characterization of plaques using 18F-FDG PET/CT in patients with carotid atherosclerosis and correlation with matrix metalloproteinase-1. *J Nucl Med.* 2007;48(2):227-33.

95. Rudd JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Woodward M, Fuster V, et al. Relationships among regional arterial inflammation, calcification, risk factors, and biomarkers: a prospective fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2(2):107-15.
96. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110(14):2032-8.
97. Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodríguez JA, et al. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(7):1369-78.
98. Abdelnaseer M, Elfayomi N, Esmail EH, Kamal MM, Hamdy A, Samie RMA, et al. Relationship between matrix metalloproteinase-9 and common carotid artery intima media thickness. *Neurol Sci*. 2016;37(1):117-22.
99. Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Páramo JA. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(1):91-7.
100. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(4):C779-84.
101. Cimmino G, Ragni M, Cirillo P, Petrillo G, Loffredo F, Chiariello M, et al. C-reactive protein induces expression of matrix metalloproteinase-9: a possible link between inflammation and plaque rupture. *Int J Cardiol*. 2013;168(2):981-6.
102. Erman H, Gelisgen R, Cengiz M, Tabak O, Erdenen F, Uzun H. The association of vascular endothelial growth factor, metalloproteinases and their tissue inhibitors with cardiovascular risk factors in the metabolic syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(6):1015-22.
103. Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19161-4.
104. Bashan N, Burdett E, Hundal HS, Klip A. Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O₂ in muscle cells in culture. *Am J Physiol*. 1992;262(3 Pt 1):C682-90.
105. Vallabhajosula, S., Machac, J., Knesaurek, K. K., Telsey, J., Lipszyc, H., Bastidas, D. A., ... & Buchsbaum, M. (1996, May). Imaging atherosclerotic macrophage density by positron emission tomography using F-18-fluorodeoxyglucose (FDG). In *Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 37, No. 5, pp. 144-144). 1850 SAMUEL MORSE DR, RESTON, VA 22090-5316: SOC NUCLEAR MEDICINE INC.
106. Davies JR, Rudd JH, Weissberg PL. Molecular and metabolic imaging of atherosclerosis. *J Nucl Med*. 2004;45(11):1898-907.
107. Ogawa M, Ishino S, Mukai T, Asano D, Teramoto N, Watabe H, et al. (18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. *J Nucl Med*. 2004;45(7):1245-50.
108. Rudd JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Rafique A, Farkouh M, et al. (18)Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of atherosclerotic plaque inflammation is highly reproducible: implications for atherosclerosis therapy trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(9):892-6.
109. Niccoli Asabella A, Ciccone MM, Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Zito A, et al. Higher reliability of 18F-FDG target background ratio compared to standardized uptake value in vulnerable carotid plaque detection: a pilot study. *Ann Nucl Med*. 2014;28(6):571-9.
110. Huet P, Burg S, Le Guludec D, Hyafil F, Buvat I. Variability and uncertainty of 18F-FDG PET imaging protocols for assessing inflammation in atherosclerosis: suggestions for improvement. *J Nucl Med*. 2015;56(4):552-9.
111. Bucerius J, Hyafil F, Verberne HJ, Slart RH, Lindner O, Sciagra R, et al. Position paper of the Cardiovascular Committee of the European Association of Nuclear Medicine (EANM) on PET imaging of atherosclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016;43(4):780-92.
112. Yun M, Yeh D, Araujo LI, Jang S, Newberg A, Alavi A. F-18 FDG uptake in the large arteries: a new observation. *Clin Nucl Med*. 2001;26(4):314-9.
113. Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation*. 2002;105(23):2708-11.
114. Okane K, Ibaraki M, Toyoshima H, Sugawara S, Takahashi K, Miura S, et al. 18F-FDG accumulation in atherosclerosis: use of CT and MR co-registration of thoracic and carotid arteries. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33(5):589-94.
115. Tahara N, Kai H, Ishibashi M, Nakaura H, Kaida H, Baba K, et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(9):1825-31.

116. Ishii H, Nishio M, Takahashi H, Aoyama T, Tanaka M, Toriyama T, et al. Comparison of atorvastatin 5 and 20 mg/d for reducing F-18 fluorodeoxyglucose uptake in atherosclerotic plaques on positron emission tomography/computed tomography: a randomized, investigator-blinded, open-label, 6-month study in Japanese adults scheduled for percutaneous coronary intervention. *Clin Ther*. 2010;32(14):2337-47.
117. Wu YW, Kao HL, Huang CL, Chen MF, Lin LY, Wang YC, et al. The effects of 3-month atorvastatin therapy on arterial inflammation, calcification, abdominal adipose tissue and circulating biomarkers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39(3):399-407.
118. Elkhawad M, Rudd JH, Sarov-Blat L, Cai G, Wells R, Davies LC, et al. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on vascular and systemic inflammation in patients with atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5(9):911-22.
119. Fayad ZA, Mani V, Woodward M, Kallend D, Abt M, Burgess T, et al. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet*. 2011;378(9802):1547-59.
120. Silvera SS, Aidi HE, Rudd JH, Mani V, Yang L, Farkouh M, et al. Multimodality imaging of atherosclerotic plaque activity and composition using FDG-PET/CT and MRI in carotid and femoral arteries. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):139-43.
121. Kwee RM, Teule GJ, van Oostenbrugge RJ, Mess WH, Prins MH, van der Geest RJ, et al. Multimodality imaging of carotid artery plaques: 18F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2009;40(12):3718-24.
122. Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113(18):2245-52.
123. Folco EJ, Sheikine Y, Rocha VZ, Christen T, Shvartz E, Sukhova GK, et al. Hypoxia but not inflammation augments glucose uptake in human macrophages: Implications for imaging atherosclerosis with 18fluorine-labeled 2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(6):603-14.
124. Davies JR, Rudd JH, Fryer TD, Graves MJ, Clark JC, Kirkpatrick PJ, et al. Identification of culprit lesions after transient ischemic attack by combined 18F fluorodeoxyglucose positron-emission tomography and high-resolution magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2005;36(12):2642-7.
125. Moustafa RR, Izquierdo-Garcia D, Fryer TD, Graves MJ, Rudd JH, Gillard JH, et al. Carotid plaque inflammation is associated with cerebral microembolism in patients with recent transient ischemic attack or stroke: a pilot study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3(5):536-41.
126. Ogawa M, Nakamura S, Saito Y, Kosugi M, Magata Y. What can be seen by 18F-FDG PET in atherosclerosis imaging? The effect of foam cell formation on 18F-FDG uptake to macrophages in vitro. *J Nucl Med*. 2012;53(1):55-8.
127. Tahara N, Kai H, Yamagishi S, Mizoguchi M, Nakaura H, Ishibashi M, et al. Vascular inflammation evaluated by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is associated with the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(14):1533-9.
128. Paulmier B, Duet M, Khayat R, Pierquet-Ghazzar N, Laissy JP, Maunoury C, et al. Arterial wall uptake of fluorodeoxyglucose on PET imaging in stable cancer disease patients indicates higher risk for cardiovascular events. *J Nucl Cardiol*. 2008;15(2):209-17.
129. Tahara N, Kai H, Nakaura H, Mizoguchi M, Ishibashi M, Kaida H, et al. The prevalence of inflammation in carotid atherosclerosis: analysis with fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *Eur Heart J*. 2007;28(18):2243-8.
130. Moon SH, Cho YS, Noh TS, Choi JY, Kim BT, Lee KH. Carotid FDG Uptake Improves Prediction of Future Cardiovascular Events in Asymptomatic Individuals. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(8):949-56.
131. Figueroa AL, Abdelbaky A, Truong QA, Corsini E, MacNabb MH, Lavender ZR, et al. Measurement of arterial activity on routine FDG PET/CT images improves prediction of risk of future CV events. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013;6(12):1250-9.
132. Graebe M, Pedersen SF, Borgwardt L, Højgaard L, Sillesen H, Kjaer A. Molecular pathology in vulnerable carotid plaques: correlation with [18]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;37(6):714-21.
133. Pedersen SF, Graebe M, Hag AM, Højgaard L, Sillesen H, Kjaer A. Microvessel density but not neovascularization is associated with 18F-FDG uptake in human atherosclerotic carotid plaques. *Mol Imaging Biol*. 2012;14(3):384-92.
134. Pedersen SF, Græbe M, Hag AM, Højgaard L, Sillesen H, Kjær A. (18)F-FDG imaging of human atherosclerotic carotid plaques reflects gene expression of the key hypoxia marker HIF-1 α . *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;3(5):384-92.

135. Chroínín DN, Marnane M, Akijian L, Merwick A, Fallon E, Horgan G, et al. Serum lipids associated with inflammation-related PET-FDG uptake in symptomatic carotid plaque. *Neurology*. 2014;82(19):1693-9.
136. Rudd JH MK, Bansilal S, Machac J, Woodward M, Fuster V, Farkouh ME, Fayad ZA. Relationships among regional arterial inflammation, calcification, risk factors, and biomarkers: a prospective fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2:107-15.
137. Kelly PJ, Camps-Renom P, Giannotti N, Martí-Fàbregas J, Murphy S, McNulty J, et al. Carotid Plaque Inflammation Imaged by. *Stroke*. 2019;50(7):1766-73.
138. Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, Oliva B, Sánchez-González J, Macías A, et al. Vascular Inflammation in Subclinical Atherosclerosis Detected by Hybrid PET/MRI. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(12):1371-82.
139. von Reutern GM, Goertler MW, Bornstein NM, Del Sette M, Evans DH, Hetzel A, et al. Grading carotid stenosis using ultrasonic methods. *Stroke*. 2012;43(3):916-21.
140. Barnett HJM, Taylor DW, Haynes RB, Sackett DL, Peerless SJ, Ferguson GG, et al. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991;325(7):445-53.
141. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ, et al. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):448-57.
142. Erbay S, Han R, Baccei S, Krakov W, Zou KH, Bhadelia R, et al. Intracranial carotid artery calcification on head CT and its association with ischemic changes on brain MRI in patients presenting with stroke-like symptoms: retrospective analysis. *Neuroradiology*. 2007;49(1):27-33.
143. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9431):331-7.
144. Layden J, Michaels J, Bermingham S, Higgins B, Group GD. Diagnosis and management of lower limb peripheral arterial disease: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2012;345:e4947.
145. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018;39(9):763-816.
146. Patel MR, Bailey SR, Bonow RO, Chambers CE, Chan PS, Dehmer GJ, et al. ACCF/SCAI/AATS/AHA/ASE/ASNC/HFSA/HRS/SCCM/SCCT/SCMR/STS 2012 appropriate use criteria for diagnostic catheterization: American College of Cardiology Foundation Appropriate Use Criteria Task Force Society for Cardiovascular Angiography and Interventions American Association for Thoracic Surgery American Heart Association, American Society of Echocardiography American Society of Nuclear Cardiology Heart Failure Society of America Heart Rhythm Society, Society of Critical Care Medicine Society of Cardiovascular Computed Tomography Society for Cardiovascular Magnetic Resonance Society of Thoracic Surgeons. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2012;80(3):E50-81.
147. González-Diego P, Moreno-Iribas C, Guembe MJ, Viñes JJ, Vila J. Adaptation of the Framingham-Wilson coronary risk equation for the population of Navarra (RICORNA). *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(8):875-85.
148. Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177-8.
149. Demeure F, Bouzin C, Roelants V, Bol A, Verhelst R, Astarci P, et al. Head-to-Head Comparison of Inflammation and Neovascularization in Human Carotid Plaques: Implications for the Imaging of Vulnerable Plaques. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(5).
150. Ben-Haim S, Kupzov E, Tamir A, Israel O. Evaluation of 18F-FDG uptake and arterial wall calcifications using 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med*. 2004;45(11):1816-21.
151. Graebe M, Pedersen SF, Højgaard L, Kjaer A, Sillesen H. 18FDG PET and ultrasound echolucency in carotid artery plaques. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3(3):289-95.
152. Romero JR, Vasan RS, Beiser AS, Polak JF, Benjamin EJ, Wolf PA, et al. Association of carotid artery atherosclerosis with circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling: the Framingham Offspring Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2008;17(6):412-7.

153. Sapienza P, di Marzo L, Borrelli V, Sterpetti AV, Mingoli A, Cresti S, et al. Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability. *Surgery*. 2005;137(3):355-63.
154. Krupinski J, Turu MM, Font MA, Ahmed N, Sullivan M, Rubio F, et al. Increased tissue factor, MMP-8, and D-dimer expression in diabetic patients with unstable advanced carotid atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(4):405-12.
155. Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis*. 2006;187(1):161-9.
156. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. Vascular extracellular matrix in atherosclerosis. *Cardiol Rev*. 2013;21(6):270-88.
157. Rodriguez JA, Orbe J, Martinez de Lizarrondo S, Calvayrac O, Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J, et al. Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci*. 2008;13:2916-21.
158. Martínez-Aguilar E, Gómez-Rodríguez V, Orbe J, Rodríguez JA, Fernández-Alonso L, Roncal C, et al. Matrix metalloproteinase 10 is associated with disease severity and mortality in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2015;61(2):428-35.
159. Vergallo R, Crea F. Atherosclerotic Plaque Healing. Reply. *N Engl J Med*. 2021;384(3):294.
160. Grufman H, Gonçalves I, Edsfieldt A, Nitulescu M, Persson A, Nilsson M, et al. Plasma levels of high-sensitive C-reactive protein do not correlate with inflammatory activity in carotid atherosclerotic plaques. *J Intern Med*. 2014;275(2):127-33.
161. Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, et al. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;100(5):533-40.
162. Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J*. 2004;25(17):1509-16.
163. Wang W, Song X, Chen Y, Yuan F, Xu F, Zhang M, et al. The Long-Term Influence of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 in Patients with Mild to Moderate Coronary Artery Lesions in a Chinese Population: A 7-Year Follow-Up Study. *Cardiology*. 2015;132(3):151-8.
164. Orbe J, Fernandez L, Rodríguez JA, Rábago G, Belzunce M, Monasterio A, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):269-76.
165. Razuvaev A, Ekstrand J, Folkersen L, Agardh H, Markus D, Swedenborg J, et al. Correlations between clinical variables and gene-expression profiles in carotid plaque instability. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42(6):722-30.
166. Kandiah N, Goh O, Mak E, Marmin M, Ng A. Carotid stenosis: a risk factor for cerebral white-matter disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(1):136-9.
167. Hamada S, Kashiwazaki D, Yamamoto S, Akioka N, Kuwayama N, Kuroda S. Impact of Plaque Composition on Risk of Coronary Artery Diseases in Patients with Carotid Artery Stenosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(12):3599-604.
168. Zhang Y, Fang X, Hua Y, Tang Z, Guan S, Wu X, et al. Carotid Artery Plaques, Carotid Intima-Media Thickness, and Risk of Cardiovascular Events and All-Cause Death in Older Adults: A 5-Year Prospective, Community-Based Study. *Angiology*. 2018;69(2):120-9.
169. Hoogeveen RM, Pereira JPB, Nurmohamed NS, Zampoleri V, Bom MJ, Baragetti A, et al. Improved cardiovascular risk prediction using targeted plasma proteomics in primary prevention. *Eur Heart J*. 2020;41(41):3998-4007.
170. Ridker PM. Proteomics for the prediction and prevention of atherosclerotic disease. *Eur Heart J*. 2022;43(16):1578-81.
171. Nurmohamed NS, Belo Pereira JP, Hoogeveen RM, Kroon J, Kraaijenhof JM, Waissi F, et al. Targeted proteomics improves cardiovascular risk prediction in secondary prevention. *Eur Heart J*. 2022;43(16):1569-77.
172. Segal HC, Burgess AI, Poole DL, Mehta Z, Silver LE, Rothwell PM. Population-based study of blood biomarkers in prediction of subacute recurrent stroke. *Stroke*. 2014;45(10):2912-7.
173. Ganz P, Amarenco P, Goldstein LB, Sillensen H, Bao W, Preston GM, et al. Association of Osteopontin, Neopterin, and Myeloperoxidase With Stroke Risk in Patients With Prior Stroke or Transient Ischemic Attacks: Results of an Analysis of 13 Biomarkers From the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels Trial. *Stroke*. 2017;48(12):3223-31.
174. Wei L, Ke Z, Zhao Y, Cai Z. The elevated lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with the occurrence and recurrence of acute cerebral infarction. *Neuroreport*. 2017;28(6):325-30.

175. Niu Z, Hu H, Tang F. High Free Fatty Acid Levels Are Associated with Stroke Recurrence and Poor Functional Outcome in Chinese Patients with Ischemic Stroke. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(10):1102-6.
176. Lange KS, Nave AH, Liman TG, Grittner U, Endres M, Ebinger M. Lipoprotein(a) Levels and Recurrent Vascular Events After First Ischemic Stroke. *Stroke*. 2017;48(1):36-42.
177. Martí-Fàbregas J, Delgado-Mederos R, Crespo J, Peña E, Marín R, Jiménez-Xarrié E, et al. Circulating endothelial progenitor cells and the risk of vascular events after ischemic stroke. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124895.
178. Li J, Wang Y, Lin J, Wang D, Wang A, Zhao X, et al. Soluble CD40L Is a Useful Marker to Predict Future Strokes in Patients With Minor Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke*. 2015;46(7):1990-2.
179. Wu YW, Lin MS, Lin YH, Chao CL, Kao HL. Prevalence of concomitant atherosclerotic arterial diseases in patients with significant cervical carotid artery stenosis in Taiwan. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2007;23(4):433-9.
180. Bhatt DL, Eagle KA, Ohman EM, Hirsch AT, Goto S, Mahoney EM, et al. Comparative determinants of 4-year cardiovascular event rates in stable outpatients at risk of or with atherothrombosis. *JAMA*. 2010;304(12):1350-7.
181. Bonaca MP, Gutierrez JA, Cannon C, Giugliano R, Blazing M, Park JG, et al. Polyvascular disease, type 2 diabetes, and long-term vascular risk: a secondary analysis of the IMPROVE-IT trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(12):934-43.
182. Zhang Q, Wang A, Zhang S, Li N, Chen S, Zhang Y, et al. Asymptomatic polyvascular disease and the risks of cardiovascular events and all-cause death. *Atherosclerosis*. 2017;262:1-7.
183. Long TH, Criqui MH, Vasilevskis EE, Denenberg JO, Klauber MR, Fronck A. The correlation between the severity of peripheral arterial disease and carotid occlusive disease. *Vasc Med*. 1999;4(3):135-42.
184. Razzouk L, Rockman CB, Patel MR, Guo Y, Adelman MA, Riles TS, et al. Co-existence of vascular disease in different arterial beds: Peripheral artery disease and carotid artery stenosis--Data from Life Line Screening®. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):687-91.
185. Müller MD, Lyrer P, Brown MM, Bonati LH. Carotid artery stenting versus endarterectomy for treatment of carotid artery stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;2:CD000515.

ANEXOS

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

Título de proyecto: ESTUDIO DE LA PLACA CAROTÍDEA VULNERABLE: CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE METALOPROTEASAS Y LA PRESENCIA DE ACTIVIDAD INFLAMATORIA

Centros Participantes: Hospital de Navarra y Clínica Universidad de Navarra

Investigadores Principales: Eduardo Martínez-Vila

Información general

Con este escrito los investigadores del proyecto le invitan a participar en este estudio que trata de avanzar en el conocimiento de los mecanismos que provocan que una placa de ateroma se rompa y produzca síntomas como el ictus isquémico. Para avanzar en biomedicina es imprescindible realizar exámenes complementarios y analizar muestras biológicas humanas (sangre, y tejidos como las placas de ateroma) extraídas de pacientes durante el proceso asistencial. Habitualmente los materiales obtenidos para un proceso asistencial se desechan. En la actualidad, todos los hospitales que invierten en investigación están trabajando para poder aprovechar este tipo de materiales creando servicios tecnológicos especializados que se llaman Biobancos cuyo funcionamiento se ajusta a la legislación vigente (*Real Decreto 1716/2011*).

El objetivo de las pruebas que se le van a practicar es el diagnóstico y/o tratamiento de su enfermedad. Las exploraciones que se le proponen tienen como objetivo conocer mejor por qué ha sufrido un ictus. Por otro lado, se conservará el material sobrante de su atención clínica para análisis futuros, incluyendo la placa de ateroma carotídea en aquellas personas que vayan a ser sometidas a cirugía. La donación de las muestras, o la realización de exploraciones adicionales no supondrán molestia o riesgo añadido al procedimiento asistencial.

Objetivo

1-Investigar con diferentes técnicas de imagen (ecografía y PET) y análisis sanguíneos la presencia de signos que sugieren que una placa de ateroma carotídea tiene mayor riesgo de romperse y producir síntomas.

2-Participar en el desarrollo de la investigación biomédica que impulsa la Universidad de Navarra donando gratuitamente el MATERIAL SOBRENTE de las muestras que se le extraigan durante su asistencia clínica (placas de ateroma) y un volumen de sangre, para que, en vez de desecharlo, se

conserve en el Biobanco y poder utilizarlo en futuros proyectos de investigación.

Metodología empleada. Desarrollo del estudio

En este estudio se pretende incluir un total de 60 pacientes atendidos en la Unidad de Ictus del Hospital de Navarra y la Clínica Universidad de Navarra con edades comprendidas entre 50-80 años con diagnóstico de infarto cerebral (con déficit menor) o Accidente Isquémico Transitorio (AIT) de origen aterotrombótico por aterosclerosis carotídea, y pacientes con estenosis carotídea asintomática. La duración prevista del estudio es de 3 años.

A los pacientes incluidos en el estudio se les realizará:

- 1-Una extracción sanguínea
- 2-Una ecografía con contraste intravenoso
- 3-Un estudio PET con 18-FDG.
- 4-A un subgrupo de participantes (aquellos con estenosis carotídeas asintomáticas) se les realizará también un estudio PET con 11-CDP-colina.

Intervención

No se le modificará el tratamiento que Vd. toma habitualmente. Si a lo largo del estudio fueran necesarias modificaciones en su tratamiento habitual, estas serán realizadas por el/los médico/s que le atienden habitualmente.

Beneficios y riesgos

Su participación en el estudio le puede ayudar a un mejor conocimiento de su estado de salud, de los factores de riesgo cardiovascular y de las características de la placa de ateroma. También es posible que Vd. no obtenga ningún beneficio directo por participar en el estudio. No obstante, es probable que parte de la información que se obtenga pueda beneficiar en un futuro a otros pacientes y pueda contribuir a un mejor conocimiento del riesgo de ictus de la estenosis carotídea.

El estudio no implica ningún riesgo para su salud ya que la cantidad de sangre obtenida en la extracción será ligeramente superior a la cantidad extraída al realizar una analítica completa. La inyección intravenosa del contraste de ecografía (Sonovue) y de los radiofármacos utilizados para el PET carece de efectos secundarios relevante y se utilizan de forma habitual para estudiar diferentes tipos de enfermedades neurológicas y vasculares. Para la correcta realización de la ecografía carotídea, es necesario aplicar una pasta conductora (gel) sobre el cuello. La exploración dura habitualmente alrededor de veinte minutos. Deberá estar relajado, con los ojos abiertos, y seguir las

instrucciones que se le indiquen. El Eco-Doppler es una técnica segura, inocua y sin efectos secundarios. Para el PET se inyecta un radiofármaco y posteriormente se realiza un estudio en scanner. La duración estimada del PET es de 120 minutos y debe permanecer acostado/a y sin moverse durante todo ese tiempo.

Acontecimientos adversos

No se prevé ningún efecto adverso, y es excepcional la aparición de hipersensibilidad a alguno de los radiofármacos o el eco-contraste de ecografía. En todo momento estará acompañado por personal de enfermería y médicos expertos en este tipo de exploraciones.

Voluntariedad

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria por lo que en cualquier momento puede retirarse del mismo, sin tener que dar explicaciones y sin que se vaya a ver afectada la relación con su equipo médico habitual.

Confidencialidad

Todos los datos recogidos sobre su participación en este estudio serán considerados como confidenciales. Los resultados serán analizados por grupos o subgrupos de investigadores. Se le garantiza la absoluta confidencialidad de los datos obtenidos en el estudio. En las listas de trabajo no constará su nombre y sólo constará el número que se le haya asignado en el estudio. En el informe final del estudio o en caso de comunicar estos resultados a la comunidad científica, se mantendrá su personalidad en el anonimato.

La Clínica Universidad de Navarra se hace responsable de la custodia de los datos personales relativos a su salud, de acuerdo con la Ley de Protección de Datos 15/1999. Sin salir de sus sistemas de seguridad, solo los datos que sean necesarios para la investigación se podrán transferir al archivo informático desarrollado para la gestión del Biobanco, siempre de forma codificada para garantizar la confidencialidad de los mismos. Solo tendrá acceso a sus datos su médico o el personal autorizado por el Biobanco, y siempre bajo compromiso de confidencialidad. De acuerdo con la Ley de Protección de Datos 15/1999, usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación sus datos dirigiéndose a la unidad de protección de datos de Clínica Universidad de Navarra.

Los resultados de los estudios realizados podrán ser presentados en congresos y publicados en revistas científicas, siempre de forma anónima.

Compensación

No se prevé ningún tipo de compensación económica.

Investigadores del estudio

Si tiene alguna duda sobre algún aspecto del estudio o le gustaría comentar algún aspecto de esta información, por favor no deje de hacérselo saber a los miembros del equipo investigador. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Clínica Universidad de Navarra.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de proyecto: ESTUDIO DE LA PLACA CAROTÍDEA VULNERABLE: CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE METALOPROTEASAS Y LA PRESENCIA DE ACTIVIDAD INFLAMATORIA

Centros Participantes: Hospital de Navarra y Clínica Universidad de Navarra

Investigadores Principales: Eduardo Martínez-Vila

Yo,.....DNI

.....

(nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado
con.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria. Sé que la pruebas que me proponen tiene una finalidad de investigación.

Comprendo que tengo derecho a recibir información de los estudios realizados con las muestras que he donado.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- cuando quiera.
- sin tener que dar explicaciones
- sin que repercuta en mis cuidados médicos y humanos

Doy mi conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma del participante

Fecha


Firma del investigador

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Elevated circulating metalloproteinase 7 predicts recurrent cardiovascular events in patients with carotid stenosis: a prospective cohort study

David Moreno-Ajona¹, Pablo Irimia^{1,2,3*} , José Antonio Rodríguez^{2,4,5}, María José García-Velloso^{2,6}, Jesús López-Fidalgo⁷, Leopoldo Fernández-Alonso^{2,8}, Lukasz Grochowicz^{2,9}, Roberto Muñoz^{2,3,10}, Pablo Domínguez¹¹, Jaime Gállego-Culleré^{2,3,10} and Eduardo Martínez-Vila^{1,2,3}

Abstract

Background: Major adverse cardiovascular events are the main cause of morbidity and mortality over the long term in patients undergoing carotid endarterectomy. There are few reports assessing the prognostic value of markers of inflammation in relation to the risk of cardiovascular disease after carotid endarterectomy. Here, we aimed to determine whether matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 and MMP-10), tissue inhibitor of MMPs (TIMP-1) and in vivo inflammation studied by ¹⁸F-FDG-PET/CT predict recurrent cardiovascular events in patients with carotid stenosis who underwent endarterectomy.

Methods: This prospective cohort study was carried out on 31 consecutive patients with symptomatic (23/31) or asymptomatic (8/31) severe (> 70%) carotid stenosis who were scheduled for carotid endarterectomy between July 2013 and March 2016. In addition, 26 healthy controls were included in the study. Plasma and serum samples were collected 2 days prior to surgery and tested for MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, TIMP-1, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, high-sensitivity C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate. ¹⁸F-FDG-PET/CT focusing on several territories' vascular wall metabolism was performed on 29 of the patients because of no presurgical availability in 2 symptomatic patients. Histological and immunohistochemical studies were performed with antibodies targeting MMP-10, MMP-9, TIMP-1 and CD68.

Results: The patients with carotid stenosis had significantly more circulating MMP-1, MMP-7 and MMP-10 than the healthy controls. Intraplaque TIMP-1 was correlated with its plasma level ($r = 0.42$ $P = .02$) and with ¹⁸F-FDG uptake ($r = 0.38$ $P = .05$). We did not find any correlation between circulating MMPs and in vivo carotid plaque metabolism assessed by ¹⁸F-FDG-PET. After a median follow-up of 1077 days, 4 cerebrovascular, 7 cardiovascular and 11 peripheral vascular events requiring hospitalization were registered. Circulating MMP-7 was capable of predicting events over and above the traditional risk factors (HR = 1.15 $P = .006$). When the model was associated with the variables of interest, the risk predicted by ¹⁸F-FDG-PET was not significant.

Conclusions: Circulating MMP-7 may represent a novel marker for recurrent cardiovascular events in patients with moderate to severe carotid stenosis. MMP-7 may reflect the atherosclerotic burden but not plaque inflammation in this specific vascular territory.

Keywords: Biomarker, Carotid endarterectomy, Matrix metalloproteinases, Positron emission tomography

* Correspondence: pirimia@unav.es

¹Department of Neurology, Clínica Universidad de Navarra, Av. Pío XII 36, 31008 Pamplona, Navarra, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IDISNA), Pamplona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Atherosclerotic disease of the carotid artery is responsible for 30% of ischemic strokes [1]. Indeed, patients undergoing carotid endarterectomy have been shown to be at risk of major adverse cardiovascular events [2]. History of peripheral artery disease [2], chronic renal insufficiency [3] and ischaemic heart disease [4] have been identified as predictors of cardiovascular events following endarterectomy.

Inflammation and proteolytic activity are strongly associated with plaque instability and rupture and may predict the risk of cardiovascular events [5, 6]. However, there are few reports assessing the prognostic value of markers of inflammation in relation to the risk of cardiovascular disease after carotid endarterectomy [7].

Defects in the synthesis and breakdown of the extracellular matrix are considered key factors in the development of atherosclerotic disease and its thrombotic complications, and metalloproteinases (MMPs) are important mediators of these processes [8]. The relevance of MMPs in atherosclerosis has raised the possibility that they may be used as cardiovascular biomarkers [9]. Several studies have shown that different MMPs are more prominent in the blood of patients with carotid atherosclerosis or ischaemic stroke [7, 10–13]. Higher circulating levels of MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-12, and TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1) might contribute to carotid plaque instability due to inflammatory mechanisms [7, 10]. However, studies into the relationship between MMPs and the metabolic activity of the vascular wall, measured by ¹⁸fluorine-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography combined with computed tomography (¹⁸F-FDG-PET/CT), as an indirect measure of carotid inflammation *in vivo*, have produced conflicting results [11, 12, 14].

Here, we aimed to determine whether matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 and MMP-10), tissue inhibitor of MMPs (TIMP-1) and vascular ¹⁸F-FDG-PET/CT predict recurrent cardiovascular events in patients with carotid stenosis who underwent endarterectomy.

Methods

Study population

In this prospective, longitudinal, hospital-based cohort study, 31 consecutive patients with symptomatic or asymptomatic severe (>70%) carotid stenosis who were scheduled for carotid endarterectomy at Clínica Universidad de Navarra or Hospital de Navarra (Spain) were recruited between July 2013 and March 2016. No patient was included postoperatively, and patients were excluded if there was evidence of active infection, generalized or local inflammatory disease (discounting atherosclerosis), chronic kidney disease, or neoplastic disease or if they were on haemodialysis. A complete medical history was

recorded for all patients, including details of previous stroke, transient ischaemic attack, coronary disease (myocardial infarction, angina or revascularization), intermittent claudication, arterial hypertension, smoking status, diabetes mellitus, body mass index, and grade of bilateral carotid stenosis and medication. Patients were selected for endarterectomy based on consensus among the multidisciplinary team members of the Carotid Clinic, which included vascular surgeons, cardiologists, and neurologists, who evaluated the patients before surgery. All procedures were performed under general anaesthesia by the vascular surgeons who have extensive experience in carotid endarterectomy. A blood analysis was performed no more than 2 days prior to surgery. Active smokers or patients who had stopped smoking within 2 years of recruitment were considered smokers. A carotid ultrasonography assessment was performed to determine the grade of stenosis, according to the latest guidelines [15], and this was confirmed by magnetic resonance angiography with coronal fast 3D T1-weighted sequences after administration of a single dose of intravenous gadolinium contrast, with digital subtraction and maximum-intensity projection reconstructions, using a 3-T MRI scanner (Magnetom Trio Tim, Siemens, Erlanger, Germany). Stenosis was measured following NASCET recommendations [16]. The patients were classified as symptomatic if they had had a stroke, transient ischemic attack (TIA) or *amaurosis fugax* ipsilateral to the stenotic carotid artery. Carotid ultrasonography in these patients was performed as part of routine clinical practice in the stroke unit. Asymptomatic carotid stenosis was detected in patients with a high cardiovascular risk undergoing carotid ultrasonography for screening. History of previous stroke in asymptomatic patients included non-atherosclerotic stroke. One “asymptomatic patient” was diagnosed with cancer following ¹⁸F-FDG-PET/CT imaging at the beginning of the study and was therefore excluded from the cohort. In addition, from a cohort of healthy individuals free from cardiovascular diseases, workers at the University of Navarra (Spain) who attended the Internal Medicine outpatient clinic for a general check-up, 26 subjects age and sex-matched were included (mean age 66.8 ± 3.0, males/females 16/10) for measurement of blood MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and TIMP-1. All protocols were approved by the Committee for Medical and Research Ethics. Participants gave written informed consent. Samples from patients included in the study were provided by the Biobank of the University of Navarra and were processed following standard operating procedures approved by the Research Ethics and Scientific Committees.

Biomarker assessment

Blood samples were collected after overnight fasting, no more than 2 days prior to carotid endarterectomy. The

blood was allowed to clot and was centrifuged at 2000 \times g for 10 min using a refrigerated centrifuge. The serum was removed, aliquoted and stored at -80°C until it was assayed. Plasma was obtained from citrated blood by centrifugation at 2000 \times g for 10 min using a refrigerated centrifuge, aliquoted and stored at -80°C until assayed. MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 and MMP-10 were measured in citrated plasma with a bead-based multiplex assay using Luminex technology (MILLIPLEX MAP Human MMP Magnetic Bead Panel 2, ref. HMMP2MAG-55 K; Merck, Darmstadt, Germany). TIMP-1 was assayed in serum using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (Human TIMP-1 Quantikine ELISA Kit, ref. DTM100; R&D Systems, Minneapolis, USA). MMPs and TIMP-1 were measured following the manufacturers' instructions. The inter- and intra-assay coefficients of variation for these ELISAs were $< 6\%$.

Total serum cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides were measured in fasting blood samples using standard laboratory techniques. Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was estimated using the Friedewald equation, and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was measured in an immunoassay (Immulite; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was also analysed by the Westergren method [17].

Histological assessment

Vascular segments were removed carefully at endarterectomy to preserve plaque structure. Specimens from the 31 patients undergoing carotid endarterectomy were cut into transverse pieces and fixed immediately in 4% paraformaldehyde, decalcified for 24 to 72 h at room temperature (Osteosoft; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and embedded in paraffin. Haematoxylin-eosin and van Gieson staining were used to examine the microscopic morphological features of the tissue (Nikon Optiphot-2, Japan).

For protein immunolocalization, serial tissue sections from all patients were analysed by immunohistochemistry. Antigen retrieval was performed using 10 mM citrate, pH 6.0, (MMP-10) or TE, pH 9.0, (MMP-9, TIMP-1, CD68) and a DakoCytomation Pascal pressure chamber (Dako) at 95°C for 30 min. Slides were treated with H_2O_2 for 10 min to block endogenous peroxidase activity, and sections were blocked with 5% normal goat serum in PBS. Tissue sections were incubated with antibodies targeting MMP-10 (rabbit polyclonal, Acris ref. AP07210PU-N, dil. 1:20), MMP-9 (rabbit polyclonal, Thermo Fisher ref. PA5-13199, dil. 1:800), TIMP-1 (mouse monoclonal, Merck ref. MAB13429, dil. 1:400) and CD68 (mouse monoclonal, Dako ref. GA609, dil. 1:2000), as described previously [18]. After washing, sections were incubated for 30 min with

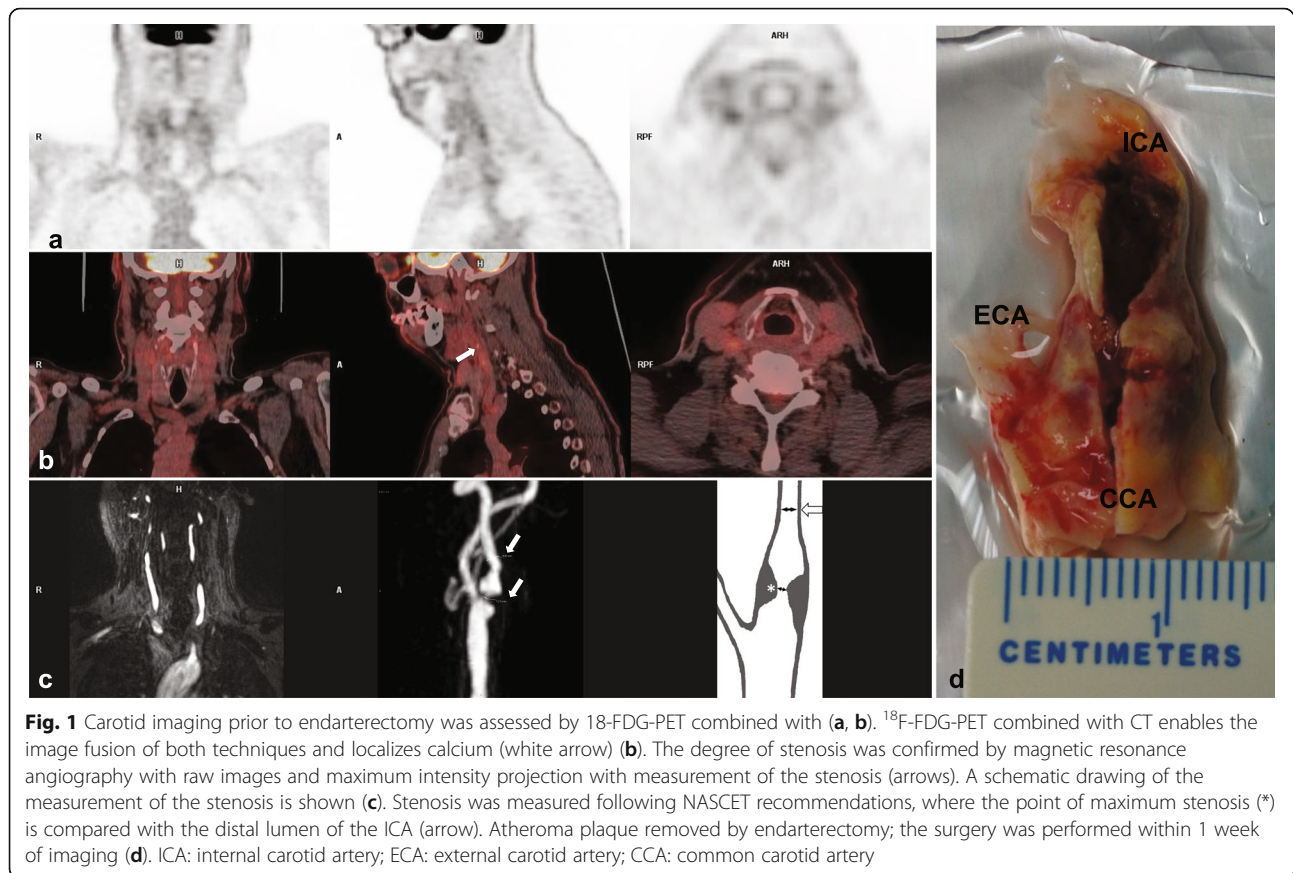
HRP-labelled polymer conjugated to anti-rabbit (ref. K4003) or anti-mouse (ref. 4001) secondary antibodies (Dako). The signal was revealed by using the DAB+ Substrate Chromogen System (Dako ref. K3468). Negative controls, prepared by omitting the primary antibody, were included in each processed batch. Three independent observers, blinded to clinical data, used a semi-quantitative visual grading scale (Additional file 2) to assess the immunostaining (0–5 scale).

Vascular ^{18}F -FDG PET/CT imaging

^{18}F -FDG-PET/CT imaging that focused on carotid wall metabolism was performed in 29 of the 31 patients (Fig. 1), as there was no presurgical availability in 2 symptomatic patients. The maximum standardized uptake value (SUVmax) was used to measure the ^{18}F -FDG uptake at the ipsilateral and contralateral carotid arteries. The target-to-background ratio (TBR) was calculated as the ratio of SUVmax measured in the atherosclerotic plaque or the arterial vessel to the venous blood pool SUVmax to correct for blood-pool uptake. Venous activity was measured as mean SUV in the ipsilateral jugular veins for carotid studies, and inferior vena cava for the other territories (aortic arch and the abdominal aorta).

Patient follow-up

Patients were followed at the outpatient service of the Department of Neurology and/or Vascular Surgery every 3 or 6 months and at the Emergency Department (median follow-up 1077 days [interquartile range, 689–1484 days]) until May 2018. The primary outcome of the study was defined as the composite of cardiovascular death, a nonfatal cardiovascular event (including stroke and myocardial infarction) or rehospitalization for acute ischaemia (TIA, *amaurosis fugax*, *angina pectoris* and peripheral artery disease) as previously described [19]. These outcomes were determined through a review of the patient's medical history. Peripheral artery disease was diagnosed with the combination of compatible symptoms, physical examination, ankle brachial index and duplex ultrasound [20]. Additional imaging (with CT angiography, MR angiography, or digital subtraction angiography) was performed when revascularization was considered [21]. Patients with symptoms of coronary disease were reviewed by the cardiology team, and coronary angiography or other complementary tests were performed in accordance with the latest guidelines [22]. The period between surgery and the day of outcome was calculated, and the overall survival and presence of recurrent cardiovascular events were calculated from the day of surgery to the date of the last follow-up available. No patients were lost to follow-up.



Statistical methods

All categorical variables are expressed as frequencies (ratios), and all the continuous variables are expressed as the mean (\pm standard error). Statistical analysis included a Shapiro-Wilk test for normality. Pearson's correlation coefficient and Spearman's correlation coefficient were used to test the correlations between MMPs and SUVmax or TBR. A Bonferroni correction for multiple comparisons (using as a reference for the p -value 0.05 divided by the number of comparisons) was made. An unpaired Student's t test was used to compare the MMP values between the patients (symptomatic and asymptomatic combined) and healthy controls, and a Cox regression for recurrent events with multiple imputation for missing data was used to determine the role of MMPs in event prediction. Hazard ratios were obtained after adjusting for relevant covariates. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to analyse the ability of MMP-7 to predict events in the population of subjects after fitting a logistic regression model. Risk factors, including age, sex, tobacco use, cholesterol levels, hypertension and diabetes mellitus, were grouped following the recommendations of a previous study [23]. Considering that the population of Navarra has higher levels of HDL-cholesterol on average, a specifically adapted version of the Framingham-Wilson Coronary Risk Equation was used to

assess global cardiovascular risk: Risk score for CORonary events in the population of NAVarra (RICORNA) [24].

Statistical significance was established at $p < .05$, and the statistical analysis, including sample size computations, was performed with the Stata software package version 15.1 for Mac (StataCorp; College Station, TX, USA).

The size of the available sample is rather small, which was the reason some non-parametric analysis was performed. For a Cox regression analysis, this sample size jointly with a significance level of 0.05 and a test power of 0.20 allows the detection of hazard ratios of size less than 0.0001 assuming a standard deviation of 0.04, which is quite good since for that we have obtained a hazard ratio of 0.006. For the worst standard deviation (we have 2.7), a hazard ratio of size 0.8300 could be detected, which is reasonably good since we obtained a hazard ratio of 1.7.

Results

This study cohort was composed of 31 subjects (mean age \pm standard deviation 67.4 \pm 2.6 years, 21/31 men) after the exclusion of one patient due to the diagnosis of bladder cancer following the ¹⁸F-FDG-PET/CT study. A similar population of 26 healthy controls (mean age

66.8 ± 3.0 years, 16/26 men) was also analysed. Among the patients, 23/31 were symptomatic (see “Study population” above), and 8/31 were asymptomatic (see Table 1 for the patients’ characteristics). The rates of hypertension and diabetes mellitus were similar, whereas other risk factors differed between the two groups (Table 1). When the baseline plasma levels of MMPs and TIMP-1 were compared, significantly higher levels of MMP-1, MMP-7 and MMP-10 were evident in the patient group, while no such differences were found for MMP-2, MMP-9 or TIMP-1 (Table 2).

MMPs and ¹⁸F-FDG PET/CT imaging

No significant correlation was found between blood levels of MMPs and the SUV of the symptomatic carotid artery (for MMP-7, $r = -0.20$ $p = .28$) or the contralateral carotid artery (for MMP-7, $r = -0.23$ $p = .21$). Similar results were obtained with the normalized TBR for the ipsilateral carotid artery (for MMP-7, $r = -0.35$ $p = .06$) or for the contralateral carotid artery (for MMP-7, $r = -0.24$ $p = .21$). SUVmax values were consistently correlated between neighbouring territories (carotid and aortic arch,

Table 2 Baseline plasma levels of MMPs and TIMP-1

Biomarker	Patients (n = 31)	Controls (n = 26)	
MMP-1, ng/ml	11.8 (9.5)	6.2 (4.1)	$p = .003$
MMP-2, ng/ml	125.3 (6.5)	135 (6.4)	$p = .3$
MMP-7, ng/ml	20.4 (6.4)	17.5 (4.1)	$p = .02$
MMP-9, ng/ml	117.8 (10.7)	123.5 (12.4)	$p = .7$
MMP-10, pg/ml	726.7 (81.6)	513.2 (40.0)	$p = .01$
TIMP-1, ng/ml	211.6 (9.4)	195.5 (8.1)	$p = .2$

Data are expressed as the mean (standard deviation). *MMP* metalloproteinase, *TIMP* tissue inhibitor of matrix metalloproteinases

$r = 0.41$ $p = .03$; carotid and abdominal aorta, $r = 0.51$ $p = .02$). However, none of the blood levels of MMPs was correlated with ¹⁸F-FDG uptake in the carotid territory, aortic arch or abdominal aorta (see table IIS in the supplementary material).

MMPs and histological findings

All endarterectomy samples corresponded to advanced atherosclerotic plaques (types V–VIII) according to the American Heart Association (AHA) histological classification [25].

Table 1 Patients’ characteristics

Clinical history and characteristics	Symptomatic (n = 23)	Asymptomatic (n = 8)		Controls (n = 26)	
Age, years (SD)	67.3 (16.0)	66.3 (22.5)	$p = .4$	66.8 (3.0)	$P = .4$
Male (%)	15 (65)	6 (75)	$p = .3$	16 (62)	$P = .3$
Hypertension (%)	17 (74)	6 (75)	$p = .6$	0	
Diabetes mellitus (%)	8 (35)	2 (10)	$p = .6$	0	
Prediabetes (%)	1 (4)	2 (25)	$p = .12$	0	
Coronary disease (%)	7 (30)	1 (12)	$p = .4$	0	
Tobacco (%)	12 (52)	7 (87)	$p = .1$	0	
Previous stroke/TIA (%)	4 (17)	2 (25)	$p = .5$	0	
BMI, kg/m ² (SD)	27.5 (1.1)	29.2 (1.3)	$p = .7$	N/A	
Grade of ipsilateral stenosis % (SD)	82.6 (16.2)	85.0 (14.2)	$p = .6$	N/A	
Grade of contralateral stenosis % (SD)	37.4 (25.0)	35.0 (23.2)	$p = .7$	N/A	
Medication					
Statins (%)	13 (57)	7 (87)	$p = .4$	0	
Anti-aggregants (%)	11 (48)	7 (87)	$p = .04$	0	
Anti-coagulants (%)	0	1 (12)	$p = .02$	0	
Blood analysis					
Leukocytes, 10 ⁹ /l (SD)	7.69 (0.43)	7.50 (0.73)	$p = .4$	N/A	
Platelets, 10 ⁹ /l (SD)	210.3 (10.1)	210.7 (13.5)	$p = .5$	N/A	
ESR, mm/h (SD)	10.86 (1.30)	4.83 (1.25)	$p = .03$	N/A	
hs-CRP, mg/l (SD)	1.94 (0.41)	1.38 (0.74)	$p = .3$	N/A	
LDL cholesterol, mg/dl (SD)	102.3 (6.2)	80.0 (10.0)	$p = .04$	N/A	
HDL cholesterol, mg/dl (SD)	44.3 (2.4)	49.7 (5.8)	$p = .8$	N/A	
Triglycerides, mg/dl (SD)	119.4 (14.5)	134.6 (27.4)	$p = .6$	N/A	

SD standard deviation, TIA transient ischemic attack, BMI body mass index, N/A not applicable, ESR erythrocyte sedimentation rate, hs-CRP high-sensitivity C-reactive protein, LDL low-density lipoprotein, HDL high-density lipoprotein, unk unknown, N/A: not applicable. Data are expressed as the total number (percentage) or mean (standard deviation)

The median of the semi-quantitative visual grading scale (0–5) for each MMP immunostaining is available in Table IS in the supplementary material. There was a significant association between CD68 and MMP-9 ($r_s = 0.42$, $p = 0.009$) or TIMP-1 ($r_s = 0.38$, $p = .018$), even after Bonferroni correction, but not with MMP-10 ($r_s = 0.28$). A moderate correlation was found between plasma and intraplaque TIMP-1 values ($r = 0.42$; $p = .02$), but there was no association between intraplaque MMP-9 or MMP-10 and their plasma concentration. The correlations between plasma MMPs and histological findings are shown in Table 3. Intraplaque TIMP-1 was correlated with its plasma level ($r = 0.42$ $p = .02$) and with ^{18}F -FDG uptake ($r = 0.38$ $p = .05$). A weak correlation did appear to exist between intraplaque CD68 (macrophage marker) and ^{18}F -FDG-PET ($r = 0.31$), yet this was not statistically significant ($p = .12$). No correlation was found between intraplaque MMPs, TIMP-1, CD68 and hs-CRP or ESR.

MMPs as predictors of recurrent cardiovascular events

After a mean follow-up of 1004 days, 4 cerebrovascular (2 ischemic strokes and 2 transient ischaemic attacks), 7 cardiovascular (4 myocardial infarctions, 3 *angina pectoris*) and 11 peripheral vascular events requiring hospitalization were registered. No deaths were recorded during the follow-up. As expected, the RICORNA risk score predicted future events (HR = 1.08 $p = .002$). When other variables were added to the model, including MMPs and the results of ^{18}F -FDG-PET, circulating MMP-7 was the only MMP capable of improving the predictive value of RICORNA (HR = 1.15 $p = .006$). The TBR of the contralateral carotid artery alone seemed to be a good predictor of such events (HR = 3.5 $p = .05$), although when the model was associated with the variables of interest, namely, RICORNA and MMP-7, the risk was not significant for TBR (HR = 2.5 $p = .15$). The inclusion of other variables, such as the remaining MMPs, TIMP-1, CRP or ESR, and ^{18}F -FDG-PET, failed to improve the prediction of cardiovascular events. Twenty multiple imputation for the 8 missing values in the variable MMP-7 and ^{18}F -FDG-PET were applied. When using only RICORNA, the model was

predictive ($P = 0.001$) and when using MMP-7 and ^{18}F -FDG-PET the model was also predictive ($P = 0.019$). This proves the good predictive behaviour of MMP-7 thanks to the use of multiple imputation for missing data. MMP-7 levels were not significantly different in patients with and without coronary disease. When ROC curves were studied with a logistic regression for MMP-7, a cut-off point of 20.48 ng/ml was established (for a probability of .4986), which led to a sensitivity of 61%, a specificity of 87%, and a positive predictive value of 80%. This probability came from maximizing the ROC (Fig. 2).

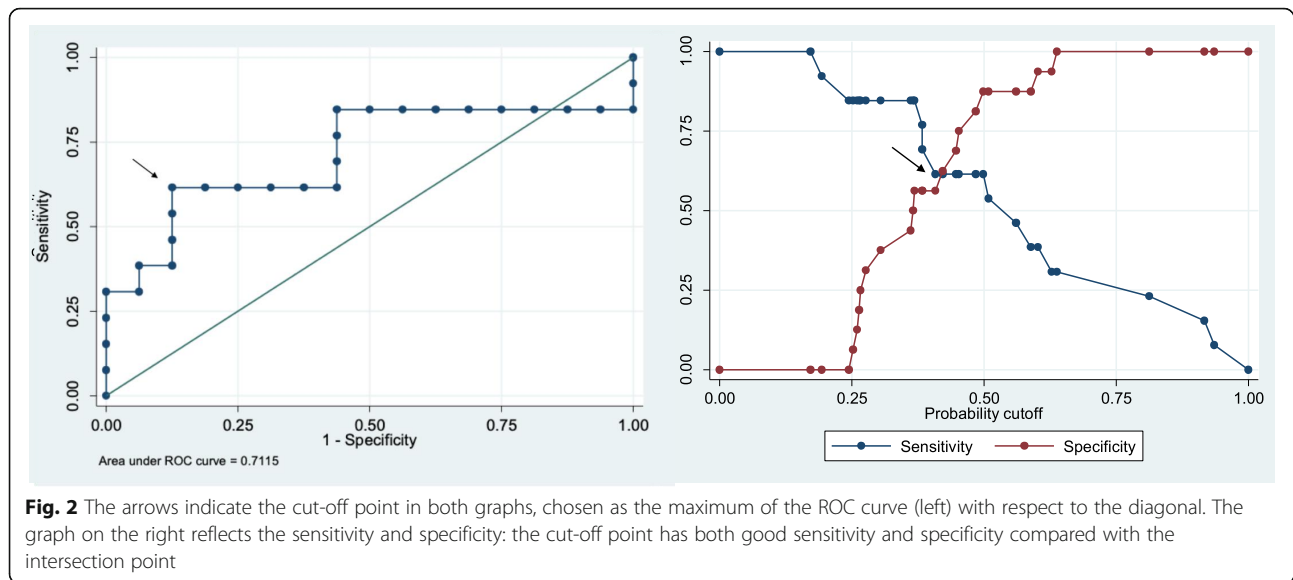
Discussion

In our cohort of patients, the circulating MMP-7 level, but not vascular ^{18}F -FDG-PET/CT focused on the carotid wall, proved to be capable of predicting cardiovascular events after a 1004-day follow-up, improving the performance of the traditional cardiovascular risk factors. This novel finding is consistent with data from a previous study [7] in which high plasma MMP-7 levels were independently associated with total mortality after a 3.5-year mean follow-up. In contrast with our study, the authors did not document an association with cardiovascular events [7]. In a previous study involving 106 endarterectomies, overexpression of the MMP-7 gene was shown to be 100-fold higher in plaques than in normal arteries [26].

The mechanisms underlying the association between MMP-7 and recurrent cardiovascular events have yet to be defined. One possible explanation is that MMP-7 may increase plaque vulnerability through inflammatory processes [8, 11], yet we did not find any correlation between circulating MMP-7 and in vivo carotid plaque inflammation assessed by ^{18}F -FDG-PET/CT. In low-inflammatory stages, ^{18}F -FDG PET/CT may be less sensitive than histology; however, we did not find a correlation between circulating and intraplaque MMPs. We could not measure intraplaque MMP-7 and thereby correlate this to its plasma level to show a direct relationship with carotid disease. The absence of a correlation between MMP levels and ^{18}F -FDG uptake in the carotid arteries, aortic arch or abdominal aorta suggests that high plasma level of MMP-7 may reflect the atherosclerosis burden but does not inform about the presence of plaque inflammation in a specific vascular territory. Additionally, arterial uptake of FDG is influenced by plaque composition. In line with our findings, the largest study to date evaluating the presence of vascular inflammation by ^{18}F -FDG-PET/MRI in individuals with atherosclerosis, showed that most FDG uptakes were detected in plaque-free arterial segments (suggesting an arterial inflammatory state at early stages of atherosclerosis) and in lipid-rich plaques [27]. Interestingly, previous studies performed in subjects with atherosclerotic disease did

Table 3 Correlation between plasma MMPs and histological findings

Histology	Plasma	Correlation	P-value
CD68	MMP-9	$r_s = 0.42$	0.009
	MMP-10	$r_s = 0.28$	0.09
	MMP-7	$r_s = 0.04$	0.83
	TIMP-1	$r_s = 0.38$	0.018
MMP-10	MMP-10	$r_s = 0.14$	0.45
MMP-9	MMP-9	$r_s = 0.37$	0.08
TIMP-1	TIMP-1	$r = 0.42$	0.02



not observe a relationship between markers of systemic inflammation and ^{18}F -FDG PET/CT in patients with carotid stenosis [11]. In the present study, all the samples corresponded to advanced calcified atherosclerotic plaques, in which an increase in calcium rarely overlaps with ^{18}F -FDG uptake [12]. A recent international multi-centre study showed that ^{18}F -FDG-PET was capable of predicting stroke recurrence although this study had a higher incidence of cerebrovascular events [28] compared to our study.

MMPs are not only produced in conjunction with inflammation. An *in vitro* study found that enriching smooth muscle cell cultures with collagen VIII stimulated MMP production, which induced cell migration [29]. Furthermore, the actions of MMPs are not only local. In fact, MMP-7 is also related to the development of hyperlipidaemia and atherosclerosis through its cleavage of lipid-free apolipoprotein A-IV, an event that plays an important role in lipid metabolism and oxidant activity [30]. All things considered, the presence of other inflammatory cell types cannot be excluded, as histological analysis detected CD68, which is expressed by phagocytes.

The presence of higher circulating levels of MMP-1 and MMP-10 in patients with carotid stenosis compared to healthy controls is in line with previous studies [31, 32], highlighting the relationship between atherosclerosis and MMPs. Surprisingly, circulating TIMP-1, believed to inhibit MMP action and contribute to plaque stability, had a weak to moderate correlation with ^{18}F -FDG-PET, probably due to the advanced stage of atherosclerosis.

The high rate of cardiovascular events we found can be explained by the extremely high prevalence of risk factors in our cohort and the systemic involvement of atherosclerosis. The presence of severe carotid stenosis has been

proposed as a risk factor for the development of stroke, white matter disease [33], coronary artery disease [34], peripheral artery disease and all-cause mortality [35]. Atherosclerosis is a systemic vascular disorder potentially involving multiple vascular territories. Our data suggest that MMP-7 may be an important mediator in the relationship between carotid stenosis and the development of recurrent cardiovascular events in different vascular territories. Nevertheless, the utility of MMP-7 as a potential biomarker may also be related to its role in other medical conditions, such as heart failure [36] as well as oncological diseases [37].

To date, several markers have been tested as potential tools to assess the risk of recurrent ischaemic stroke. The largest study tested 14 different biomarkers [38], including interleukin 6 and CRP [39], and limited utility in stroke prediction was found. Osteopontin, neopterin and myeloperoxidase [40], as well as lipoprotein-associated phospholipase A2 [41], free fatty acid levels [42] and circulating endothelial progenitor cells [43], have all been tested as recurrent stroke predictors with positive results, whereas the data regarding soluble CD40 ligand are inconsistent [40, 44]. Similar to MMP-7 in the present study, elevated lipoprotein (a) in patients with acute first ischaemic stroke [45] has been associated with a higher risk of combined recurrent cardiovascular events. However, none of these markers has been compared to MMP-7 in a similar setting, and therefore, larger studies including such patients should be performed.

The main strengths of this study are the detailed characterization of carotid plaque inflammation *in vivo* and the prolonged follow-up, with no loss. The main limitation of the study is the small number of patients, as larger studies may have identified differences in MMP-7 between symptomatic and asymptomatic patients or the utility of

the other potential biomarkers. Indeed, the consequent lack of statistical power may have hindered the discovery of the potential predictive value of ^{18}F -FDG-PET in cardiovascular events. In the histological study, the extensive decalcification required for the analysis of the endarterectomy samples may adversely affect tissue antigenicity, particularly that of extracellular proteins such as MMPs. Finally, peripheral artery disease is common in patients with carotid stenosis and we have not studied the presence of subclinical peripheral artery disease using ankle-brachial index, ultrasound, CT or MRI before endarterectomy [46]. Although our patients did not have symptoms of intermittent claudication, the presence of subclinical peripheral artery disease before endarterectomy cannot be completely excluded.

Conclusions

Our findings provide evidence that circulating (plasma) MMP-7 could represent a novel marker for recurrent cardiovascular events in patients with severe carotid stenosis. While additional studies will determine the value of MMP-7 in clinical practice, our results support the potential utility of circulating MMP-7 as a risk biomarker over and above that of conventional cardiovascular risk factors. To validate and confirm these results, larger studies with more statistical power should be carried out.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01387-3>.

Additional file 1: Table IS. Semiquantitative visual grading scale to assess immunostaining (0–5 scale). **Table IIS.** Correlations between blood levels of MMPs and ^{18}F -FDG uptake.

Additional file 2: Figures 1S, 2S, 3S and 4S. Representative images corresponding to the semiquantitative visual grading scale used to assess the immunostaining for CD-68, TIMP-1, MMP-9 and MMP-10.

Abbreviations

^{18}F -FDG PET/CT: ^{18}F Fluorine-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography combined with computed tomography; AHA: American Heart Association; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; HDL: High-density lipoprotein; hs-CRP: High-sensitivity C-reactive protein; LDL: Low-density lipoprotein cholesterol; MMPs: Metalloproteinases; NASCET: North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial; RICORNA: Risk score for coronary events in the population of Navarra; ROC: Receiver operating characteristic; SUVmax: Standardized uptake value; TBR: Target-to-background ratio; TIA: Transient ischaemic attack; TIMP-1: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1

Acknowledgements

We want to thank Adrian Arregui and Lara Montori for their excellent technical assistance. We particularly acknowledge the patients for their participation, the Biobank of the University of Navarra and the Platform of Morphology of CIMA.

Authors' contributions

Conception and design: DMA, PI, EMV, JGC. Analysis and interpretation: DMA, PI, JAR, JLF, EMV. Data collection: DMA, PI, JAR. Writing the article: DMA, PI, JAR, MJGV, JLF, PD. Critical revision of the article: PI, JAR, MJGV, JLF, LFA, LG, RM, PD, JGC, EMV. Final approval of the article: DMA, PI, JAR, MJGV, JLF, LFA, LG, RM, PD, JGC, EMV. Statistical analysis: DMA, JLF. Obtained funding: PI,

EMV, Overall responsibility: PI, EMV. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Study recruitment, MMP determinations, PET studies and collection of data sets were supported by grants from the Spanish Research Network on Cerebrovascular Diseases (RETICS-INVICTUS plus -RD12/0014/0009-). The storage and use of human biological samples was partially supported by the Biobank of the Foundation for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra (Pamplona, Spain).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Ethics approval and consent to participate

All protocols were approved by the Committee for Medical and Research Ethics, *Comité de ética de la Investigación* of the University of Navarra. Project: 058/2012. Participants gave written informed consent. Samples from patients included in the study were provided by the Biobank of the University of Navarra and were processed following standard operating procedures approved by the Research Ethics and Scientific Committees.

Consent for publication

Written informed consent for publication was obtained from all participants.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Neurology, Clínica Universidad de Navarra, Av. Pío XII 36, 31008 Pamplona, Navarra, Spain. ²Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IDISNA), Pamplona, Spain. ³Red de Investigación Cooperativa de Enfermedades Vasculares Cerebrales (INVICTUS PLUS), Madrid, Spain. ⁴Laboratory of Atherothrombosis, Program of Cardiovascular Diseases, CIMA-Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain. ⁵CIBERCV, Madrid, Spain. ⁶Department of Nuclear Medicine, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain. ⁷Universidad de Navarra, ICS, Unidad de Estadística, 31008 Pamplona, Spain. ⁸Department of Vascular Surgery, Complejo Hospitalario de Navarra, 31008 Pamplona, Spain. ⁹Department of Vascular Surgery, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain. ¹⁰Department of Neurology, Complejo Hospitalario de Navarra, 31008 Pamplona, Spain. ¹¹Department of Radiology, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain.

Received: 25 October 2019 Accepted: 10 February 2020

Published online: 26 February 2020

References

1. Ay H, Furie KL, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2005;58(5):688–97.
2. Vilarino-Rico J, Pita-Fernandez S, Segura-Iglesias RJ. Clinical predictors of major adverse cardiovascular events during long-term follow-up after carotid endarterectomy. *Ann Vasc Surg*. 2015;29(3):419–25.
3. Avgerinos ED, Go C, Ling J, Makaroun MS, Chaer RA. Survival and long-term cardiovascular outcomes after carotid endarterectomy in patients with chronic renal insufficiency. *Ann Vasc Surg*. 2015;29(1):15–21.
4. Nam HJ, Heo SH, Kim BJ, San Lee J, Youn HC, Lee JS, et al. Long-term outcome after Carotid Endarterectomy in patients with ischemic heart disease. *World Neurosurg*. 2018;110:e806–e14.
5. Castillo J, Alvarez-Sabin J, Martinez-Vila E, Montaner J, Sobrino T, Vivancos J, et al. Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J Neurol*. 2009;256(2):217–24.
6. Rodriguez JA, Orbe J, Paramo JA. Metalloproteinases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(9):959–67.
7. Abbas A, Aukrust P, Russell D, Krohg-Sorensen K, Almas T, Bundgaard D, et al. Matrix metalloproteinase 7 is associated with symptomatic lesions and adverse events in patients with carotid atherosclerosis. *PLoS One*. 2014;9(11):e84935.
8. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. Vascular extracellular matrix in atherosclerosis. *Cardiol Rev*. 2013;21(6):270–88.

9. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8):827–39.
10. Hansson J, Vasan RS, Arnlov J, Ingelsson E, Lind L, Larsson A, et al. Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: cohort study. *PLoS One*. 2011;6(11):e16185.
11. Duivenvoorden R, Mani V, Woodward M, Kallend D, Suchankova G, Fuster V, et al. Relationship of serum inflammatory biomarkers with plaque inflammation assessed by FDG PET/CT: the dal-PLAQUE study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013;6(10):1087–94.
12. Rudd JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Woodward M, Fuster V, et al. Relationships among regional arterial inflammation, calcification, risk factors, and biomarkers: a prospective fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2(2):107–15.
13. Mahdessian H, Perisic Matic L, Lengquist M, Gertow K, Sennblad B, Baldassarre D, et al. Integrative studies implicate matrix metalloproteinase-12 as a culprit gene for large-artery atherosclerotic stroke. *J Intern Med*. 2017;282(5):429–44.
14. Wu YW, Kao HL, Huang CL, Chen MF, Lin LY, Wang YC, et al. The effects of 3-month atorvastatin therapy on arterial inflammation, calcification, abdominal adipose tissue and circulating biomarkers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39(3):399–407.
15. von Reutern GM, Goertler MW, Bornstein NM, Del Sette M, Evans DH, Hetzel A, et al. Grading carotid stenosis using ultrasonic methods. *Stroke*. 2012; 43(3):916–21.
16. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial C, Barnett HJM, Taylor DW, Haynes RB, Sackett DL, Peerless SJ, et al. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991;325(7):445–53.
17. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ, et al. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):448–57.
18. Orbe J, Montero I, Rodriguez JA, Beloqui O, Roncal C, Paramo JA. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(1):91–7.
19. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9431):331–7.
20. Layden J, Michaels J, Birmingham S, Higgins B, Guideline DG. Diagnosis and management of lower limb peripheral arterial disease: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2012;345:e4947.
21. Aboyans V, Ricco JB, MEL B, Bjorck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018;39(9):763–816.
22. Patel MR, Bailey SR, Bonow RO, Chambers CE, Chan PS, Dehmer GJ, et al. ACCF/SCAI/AATS/AHA/ASE/ASNC/HFSA/HRS/SCCM/SCCT/SCMR/STS 2012 appropriate use criteria for diagnostic catheterization: American College of Cardiology Foundation Appropriate Use Criteria Task Force Society for Cardiovascular Angiography and Interventions American Association for Thoracic Surgery American Heart Association, American Society of Echocardiography American Society of Nuclear Cardiology Heart Failure Society of America Heart Rhythm Society, Society of Critical Care Medicine Society of Cardiovascular Computed Tomography Society for Cardiovascular Magnetic Resonance Society of Thoracic Surgeons. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2012;80(3):E50–81.
23. Figueroa AL, Abdelbaky A, Truong QA, Corsini E, MacNabb MH, Lavender ZR, et al. Measurement of arterial activity on routine FDG PET/CT images improves prediction of risk of future CV events. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013;6(12):1250–9.
24. Gonzalez-Diego P, Moreno-Iribas C, Guembe MJ, Vines JJ, Vila J. Adaptation of the Framingham-Wilson coronary risk equation for the population of Navarra (RICORNA). *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(8):875–85.
25. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177–8.
26. Razuvaev A, Ekstrand J, Folkersen L, Agardh H, Markus D, Swedenborg J, et al. Correlations between clinical variables and gene-expression profiles in carotid plaque instability. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42(6):722–30.
27. Fernandez-Friera L, Fuster V, Lopez-Melgar B, Oliva B, Sanchez-Gonzalez J, Macias A, et al. Vascular inflammation in subclinical atherosclerosis detected by hybrid PET/MRI. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(12):1371–82.
28. Kelly PJ, Camps-Renom P, Giannotti N, Marti-Fabregas J, Murphy S, McNulty J, et al. Carotid plaque inflammation imaged by (18)F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography and risk of early recurrent stroke. *Stroke*. 2019;50(7):1766–73.
29. Hou G, Mulholland D, Gronska MA, Bendeck MP. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am J Pathol*. 2000;156(2):467–76.
30. Park JY, Park JH, Jang W, Hwang IK, Kim IJ, Kim HJ, et al. Apolipoprotein A-IV is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *J Biochem*. 2012;151(3):291–8.
31. Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 2004;40(3):469–75.
32. Martinez-Aguilar E, Gomez-Rodriguez V, Orbe J, Rodriguez JA, Fernandez-Alonso L, Roncal C, et al. Matrix metalloproteinase 10 is associated with disease severity and mortality in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2015;61(2):428–35.
33. Kandiah N, Goh O, Mak E, Marmin M, Ng A. Carotid stenosis: a risk factor for cerebral white-matter disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(1):136–9.
34. Hamada S, Kashiwazaki D, Yamamoto S, Akioka N, Kuwayama N, Kuroda S. Impact of plaque composition on risk of coronary artery diseases in patients with Carotid artery stenosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(12):3599–604.
35. Zhang Y, Fang X, Hua Y, Tang Z, Guan S, Wu X, et al. Carotid artery plaques, Carotid intima-media thickness, and risk of cardiovascular events and all-cause death in older adults: a 5-year prospective, Community-Based Study. *Angiology*. 2018;69(2):120–9.
36. Cuvelliez M, Vandewalle V, Brunin M, Beseme O, Hulot A, de Groote P, et al. Circulating proteomic signature of early death in heart failure patients with reduced ejection fraction. *Sci Rep*. 2019;9(1):19202.
37. Klupp F, Neumann L, Kahlert C, Diers J, Halama N, Franz C, et al. Serum MMP7, MMP10 and MMP12 level as negative prognostic markers in colon cancer patients. *BMC Cancer*. 2016;16:494.
38. Segal HC, Burgess AI, Poole DL, Mehta Z, Silver LE, Rothwell PM. Population-based study of blood biomarkers in prediction of subacute recurrent stroke. *Stroke*. 2014;45(10):2912–7.
39. Singh TP, Morris DR, Smith S, Moxon JV, Golledge J. Systematic review and meta-analysis of the association between C-reactive protein and major cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2017;54(2):220–33.
40. Ganz P, Amarenco P, Goldstein LB, Silleisen H, Bao W, Preston GM, et al. Association of Osteopontin, Neopterin, and myeloperoxidase with stroke risk in patients with prior stroke or transient ischemic attacks: results of an analysis of 13 biomarkers from the stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels Trial. *Stroke*. 2017;48(12):3223–31.
41. Wei L, Ke Z, Zhao Y, Cai Z. The elevated lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with the occurrence and recurrence of acute cerebral infarction. *Neuroreport*. 2017;28(6):325–30.
42. Niu Z, Hu H, Tang F. High free fatty acid levels are associated with stroke recurrence and poor functional outcome in Chinese patients with ischemic stroke. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(10):1102–6.
43. Marti-Fabregas J, Delgado-Mederos R, Crespo J, Pena E, Marin R, Jimenez-Xarrie E, et al. Circulating endothelial progenitor cells and the risk of vascular events after ischemic stroke. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124895.
44. Li J, Wang Y, Lin J, Wang D, Wang A, Zhao X, et al. Soluble CD40L is a useful marker to predict future strokes in patients with minor stroke and transient ischemic attack. *Stroke*. 2015;46(7):1990–2.
45. Lange KS, Nave AH, Liman TG, Grittner U, Endres M, Ebinger M. Lipoprotein(a) levels and recurrent vascular events after first ischemic stroke. *Stroke*. 2017; 48(1):36–42.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.