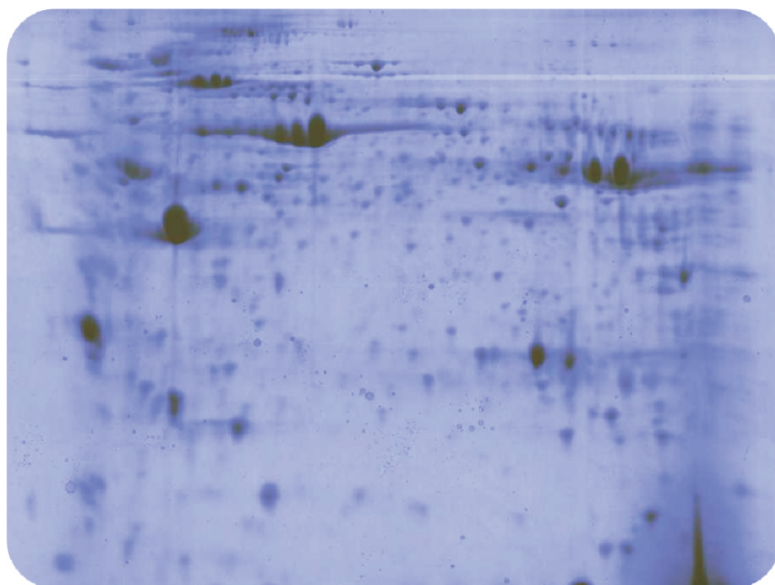




PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DE PLACAS DE ATEROMA CAROTÍDEAS



TESIS DOCTORAL

Iván Cristobo Luaces

Santiago de Compostela

2008



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DE PLACAS DE ATEROMA CAROTÍDEAS.

Tesis doctoral

Iván Cristobo Luaces

2008



Prof. José Castillo SÁNCHEZ
CATEDRÁTICO DE NEUROLOGÍA

SERVICIO DE NEUROLOGÍA
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO
TRAVESÍA DE LA CHOUpanA s/n
15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA

D. José CASTILLO SÁNCHEZ, Catedrático de Neurología de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe de Sección de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y **D. Miguel BLANCO GONZÁLEZ**, Adjunto Clínico de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN

que **D. Iván CRISTOBO LUACES** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo titulado ***PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DE PLACAS DE ATEROMA CAROTÍDEAS***.

Revisado el mismo, manifestamos nuestra conformidad para su presentación y defensa como Tesis para optar al Grado de Doctor.

Santiago de Compostela, 12 de marzo de 2008.

Fdo. Prof. José Castillo

Fdo. Dr. Miguel Blanco

A realización deste traballo foi posible grazas ó disfrute por parte de *D. Iván Jesús Cristobo Luaces*, dun contrato de investigador en formación e perfeccionamento do Programa María Barbeito (IN808C), dentro do Programa de Recursos Humanos do Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica, da Consellería de Innovación e Industria da Xunta de Galicia.

Este traballo tamén foi financiado coa subvención concedida pola Consellería de Sanidade da Xunta de Galicia para a realización de proxectos de investigación en biomedicina e ciencias da Saúde nos centros do sistema sanitario galego (código PS07/29).

Sé todo en cada cosa...

Pon cuanto eres en lo mínimo que hagas...

AGRADECIMIENTOS

Este apartado es el último en escribirse posiblemente debido a su complicación. Resulta difícil poder agradecer todo el trabajo, apoyo, colaboraciones, ánimos...que tantas personas han prestado; por ello, intentaré ser breve y no olvidarme de nadie.

Me gustaría comenzar agradeciéndoles al Dr. Castillo y al Dr. Tomás Sobrino, la gran oportunidad que me han ofrecido accediendo a este grupo de investigación y la gran confianza que han depositado en mí, permitiéndome desarrollar mi carrera científica en un equipo multidisciplinar de alto nivel, tanto personal como profesional.

Gracias al Dr. Blanco por toda la ayuda prestada para llevar a cabo esta tesis, por sus ideas, consejos y paciencia; y porque es un lujo poder aprender patología carotídea de un especialista como él.

Al resto de compañeros “clínicos” (Dr. Leira, Dr. Rodríguez-Yáñez, Dr. Santos) y “residentes” (Dras.Susana Arias y Xiana Rodríguez), por facilitarme el acercamiento a la práctica clínica diaria.

La realización de este trabajo no sería posible sin las muestras. Así, agradecer la colaboración de los pacientes para poder llevar a cabo este trabajo. Asimismo, a aquellos que han aportado el material, como el Dr. Pumar, y demás componentes de su grupo de Neurorradiología intervencionista del Hospital Clínico de Santiago, el Dr. Vivancos del Hospital de la Princesa de Madrid, en especial al Dr. Nombela, al Dr. Dávalos del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, y en especial a la Dra. Pérez de la Ossa, y al Dr. Serena y a la Dra. Silva del Hospital Josep Trueta de Girona.

El Dr. Forteza, jefe de servicio de Anatomía patológica, me ha prestado una gran ayuda, pudiendo contar con todos sus conocimientos sobre la patología ateros-

clerótica; al igual que Ángel, que me ha enseñado y ayudado enormemente con las técnicas anatomopatológicas.

Al mismo tiempo, no me puedo olvidar del resto de compañeros del laboratorio (Octavio, Pedro, Jesús, Miguel Ángel, Lorena, María) y de las psicólogas (María/s e Isabel), por el día a día en el laboratorio, por sus consejos, por su ayuda y por los buenos momentos que me hacen pasar. A David, además, por su experiencia en el campo de la proteómica, que tanto me ha ayudado, al igual que con el “Word”.

El haber llegado hasta aquí no es sólo mérito mío. Los máximos responsables son mis padres y mis hermanos. Ellos me han proporcionado la educación, el cariño y la fuerza para seguir adelante, más aún cuando las cosas se complican. Este trabajo quiero dedicárselo especialmente, por todo el esfuerzo que han hecho durante tantos años para permitir que esté donde estoy, y por ser lo que soy.

Quiero recordar también el papel de los maestros en mi educación y formación, donde surgió mi pasión por la ciencia y la investigación; en un colegio donde nuestro lema era: “Educación, respeto y trabajo” (máxima que sigo hoy en día). El resto de mi carrera educativa no ha servido más que para reafirmar mi dedicación y compromiso con la ciencia, impulsado por el profesor Vilaboa en el instituto, y por Rosa Tarrío y Francisco Rodríguez Trelles en mis comienzos investigadores.

Por último agradecer a Raquel, el apoyo incondicional que me ha prestado desde el primer instante que nos conocimos, compartiendo la pasión por la biología; y el aporte de alegría y buenos momentos que me hace pasar a lo largo del día, haciendo todo más llevadero. Y como no, su infinita paciencia...

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

Enfermedad cerebrovascular: ictus	13
Definición.....	13
Epidemiología	13
Clasificación	16
Factores de riesgo vascular	21
Factores de riesgo no modificables	21
Factores de riesgo modificables	23
Fisiopatología del ictus isquémico	26
La cascada isquémica neuronal.....	28
La glía en la isquemia cerebral	33
Alteraciones microcirculatorias en la isquemia cerebral	35
Marcadores moleculares de utilidad diagnóstica y pronóstica	39
Exploraciones vasculares en el ictus.	43
Ultrasonografía	43
Arteriografía	49
Aterosclerosis	53
Patogenia.....	54
Inicio de la lesión: la estría grasa.....	54
Progresión de la placa aterosclerótica	58
Estabilidad de la placa: proceso aterotrombótico	60
Estudio morfológico de la placa de ateroma.....	70
Estudio histopatológico	70
Estudio clínico-vascular.....	75
Tratamiento y prevención.....	80

Tratamiento médico	80
Tratamiento quirúrgico	83
Tratamiento endovascular	87
Elección del mejor tratamiento	94
Proteómica	100
Proteómica de expresión	102
Electroforesis bidimensional	102
Espectrometría de masas	106
Otras técnicas	110
Importancia biomédica	112
HIPÓTESIS	117
OBJETIVOS	121
JUSTIFICACIÓN	125
PACIENTES Y MÉTODOS	
Sujetos de estudio	129
Criterios de selección	129
Criterios de inclusión	130
Criterios de exclusión	130
Grupos de estudio	130
Evaluación clínica	132
Clasificación etiológica	132
Evaluación ultrasonográfica	132
Evaluación radiológica	134
Evaluación intervencionista	136
Indicaciones de endarterectomía carotídea	136
Indicaciones de stenting carotídeo	138
Evaluación molecular	138
Evaluación proteómica	139

Extracción de proteínas del material capturado en los DPD	140
Electroforesis bidimensional	142
Primera dimensión	142
Segunda dimensión	143
Tinción de los geles	145
Digitalización de los geles	146
Análisis de imagen	148
Análisis por espectrometría de masas	150
Evaluación inmunohistoquímica	152
Evaluación histológica.....	156
RESULTADOS	
Análisis descriptivo	161
Características epidemiológicas	162
Características bioquímicas.....	163
Análisis comparativo.....	164
Análisis del material recogido	164
Electroforesis bidimensional	165
Patrones de expresión	165
Estudio comparativo	166
Espectrometría de masas.....	174
Diferencias cualitativas	174
Diferencias cuantitativas.....	176
Anatomía patológica.....	177
Histología	177
Inmunohistoquímica	184

DISCUSIÓN	
Dificultades en el estudio de la aterosclerosis	199
Nueva aproximación	201
Estudio del material capturado en los DPD	203
Estudio de las proteínas identificadas.....	206
ANXA5.....	207
NP	211
TAGLN2	214
GSTK1.....	215
Otras proteínas	218
Visión conjunta	223
Resumen.....	226
CONCLUSIONES	231
ANEXOS	
Resultados de espectrometría de masas	
GSTK1	235
PSMB8	237
ANXA5.....	240
HP	242
TAGLN2.....	244
BPGM.....	246
NP	248
BIBLIOGRAFÍA	253

ABREVIATURAS

[]: concentración
1DE: electroforesis unidimensional
2DE: electroforesis bidimensional
ACA: arteria cerebral anterior
ACE: arteria carótida externa
ACI: arteria carótida interna
ACP: arteria cerebral posterior
ADN: ácido desoxirribonucleico
AIT: ataque isquémico transitorio
AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANXA5: anexina A5
ARN: ácido ribonucleico
ATP: adenosín trifosfato
ATP: angioplastia transluminal percutánea
BPGM: bifosfoglicerato mutasa
Ca⁺⁺: ión calcio
CAS: stenting de la arteria carótida
CD40L: ligando del clúster de diferenciación 40
CEA: endarterectomía carotídea
Cl⁻: anión cloruro
ClH: ácido clorhídrico
CML: células de músculo liso
CO₂: dióxido de carbono
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimethylamonio]-1-propano sulfonato
Da: dalton
dB: decibelios
DPD: dispositivo de protección distal
DTC: doppler transcraneal
DTT: dithiothreitol
FSC: flujo sanguíneo cerebral
GABA: ácido gamma aminobutírico
GLN: glutamina
GLU: glutamato
GLY: glicina
GST: glutatión transferasa
GSTK1: glutatión s transferasa kappa 1
Hb: hemoglobina
HDL: lipoproteína de alta densidad
HP: haptoglobina
IAM: infarto agudo de miocardio
ICAM: molécula de adhesión intercelular
IL: interleuquina

IVUS: ultrasonidos intravasculares
K⁺: potasio
LDL: lipoproteína de baja densidad
M: molaridad
MALDI-TOF: ionización desorción láser asistida por matriz – tiempo de vuelo
MCP: proteína quimiotáctica de monocitos
M-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos
MES: microembolias
MMP: metaloproteasa de matriz
MS: espectrometría de masas
Na⁺: sodio
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: óxido nítrico
NOS: sintasa de óxido nítrico
NP: nucleósido fosforilasa
O₂⁻: anión superóxido
OCT: tomografía de coherencia óptica
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONNO⁻: peroxinitrito
PAI: inhibidor del activador del plasminógeno
PCR: proteína C reactiva
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PSMB8: subunidad 8 del proteosoma tipo B
RM: resonancia magnética
ROS: especies reactivas de oxígeno
SDS: dodecil sulfato sódico
TAGLN2: transgelina 2
TBST: tampón Tris salino con Tween-20
TC: tomografía computerizada
TE: tampón EDTA
TF: factor tisular
TGF: factor de crecimiento transformante
TGS: Tris glicina SDS
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
TRIS: trishidroximetilaminometano
TSA: troncos supraaórticos
uPA: activador urokinasa del plasminógeno
V: voltio
VCAM: molécula de adhesión celular vascular
VH: voltio hora
VLDL: lipoproteína de muy baja densidad
W: watios

INTRODUCCIÓN

Enfermedad cerebrovascular: ictus

Definición

La Enfermedad Cerebrovascular (ECV) es el conjunto de manifestaciones funcionales y/o estructurales, sintomáticas o asintomáticas, del sistema nervioso central derivadas de alteraciones de la circulación cerebral.

Dentro de las enfermedades cerebrovasculares se encuentra el ictus, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) define como: “el desarrollo clínico rápido de signos focales de alteración de la función cerebral sin otra causa aparente que no sea el origen vascular [1]”.

La isquemia cerebral es el resultado de una disminución del flujo sanguíneo cerebral hasta un nivel suficiente como para provocar alteraciones metabólicas y bioquímicas que producen necrosis celular y alteran el funcionamiento del sistema nervioso. Dependiendo del territorio afectado, hablamos de isquemia cerebral focal cuando existe un área de disminución de flujo limitada a una zona del encéfalo, y de isquemia cerebral global cuando se afecta la totalidad del tejido, como ocurre en el caso de paro cardíaco o shock prolongado.

Epidemiología

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Según la OMS, representa la tercera causa de muerte y la primera

de invalidez en la población adulta en el mundo. En España, según los datos correspondientes al año 2002 del Instituto Nacional de Estadística (INE), y en Galicia según los datos del Plan de Saúde 2005-2009, el ictus isquémico es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en varones, suponiendo el 10% de la mortalidad global [2, 3]. Mientras la mayoría de los países desarrollados muestran tasas estables de mortalidad por ictus, los países en desarrollo incrementan sus tasas anuales de prevalencia y mortalidad: 4,5 de los 10 millones de fallecimientos anuales por ictus pertenecen a los países no industrializados. En España, su incidencia es de 174 casos nuevos por 100.000 habitantes/año [4], y su tasa de mortalidad de 97,7 por cada 100.000 habitantes/año; siendo ligeramente superior en mujeres (111,9 por 100.000 habitantes/año) que en hombres (82,9 por 100.000 habitantes/año) [5].

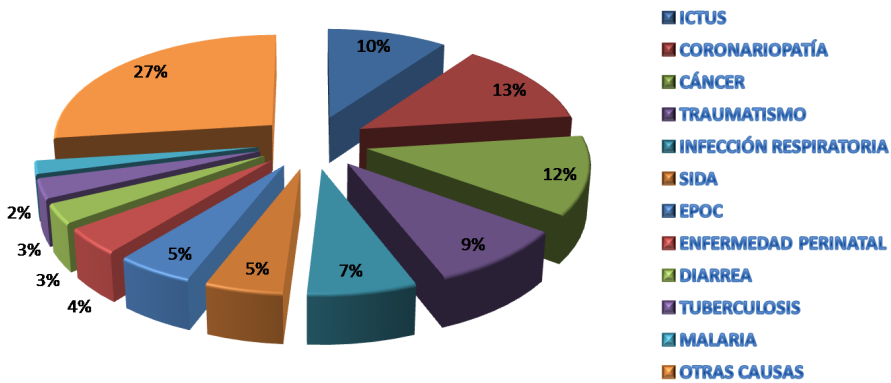


Ilustración 1. Causas de muerte en el mundo según la OMS (2002).

El ictus es, además, la primera causa de discapacidad en adultos. De los supervivientes, aproximadamente el 31% necesita ayuda para realizar sus actividades de la vida diaria, el 20% necesita ayuda para caminar, el 16% requieren cuidados institucionales y hasta un 25% presentará, después del ictus, un deterioro cognitivo en mayor o menor grado.

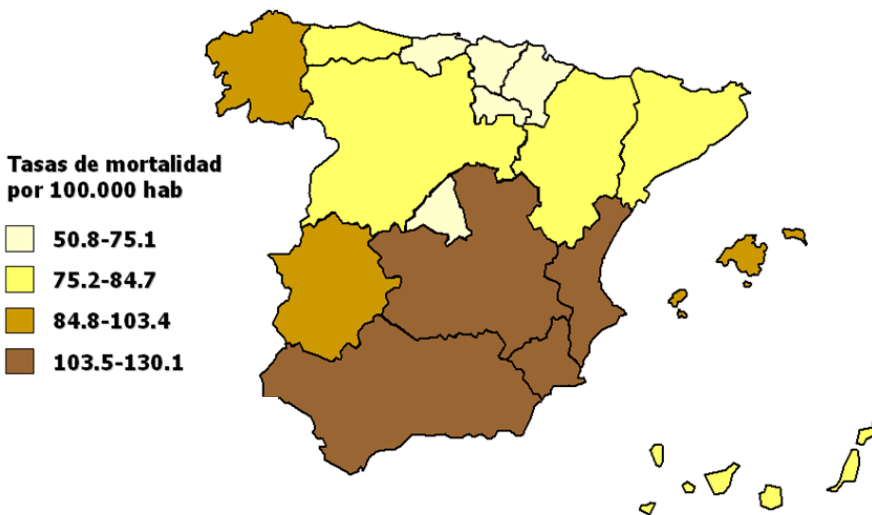


Ilustración 2. Mortalidad en España por ictus por Comunidades Autónomas.

Por todo ello, el ictus supone un problema de salud que obliga a establecer mejores pautas de prevención y tratamiento para reducir tanto su incidencia como el grado de discapacidad que origina. Teniendo en cuenta que la incidencia aumenta en personas mayores de 65 años y que, en base a una mejora en la calidad de vida, se está produciendo un incremento notable en la esperanza de vida y un envejecimiento progresivo de la población mundial,

la prevalencia de esta enfermedad aumenta, y con ella, la magnitud del problema sociosanitario que supone.

Clasificación

El ictus puede dividirse en dos grandes grupos:

- Isquémico: resultado de la reducción temporal (ataque isquémico transitorio o AIT) o permanente (ictus isquémico) del flujo sanguíneo cerebral, debido a una obstrucción local o a un émbolo.

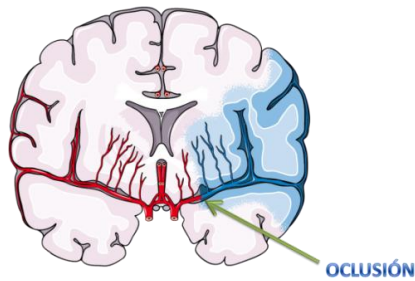


Ilustración 3. Representación de un ictus isquémico.

Los ataques isquémicos transitorios (AIT) se definen como la disfunción cerebral focal o monocular, con una duración de los síntomas inferior a 1 hora, causada por la alteración cualitativa o cuantitativa vascular debida a trombosis o embolia arterial en relación con enfermedad arterial, cardíaca o hematológica [6].

El ictus isquémico está ocasionado por la alteración cualitativa o cuantitativa del aporte circulatorio a un territorio encefálico, que

determina un déficit neurológico de más de 24 horas de duración, lo cual es expresión de una necrosis tisular.

- Hemorrágico: provocado por la extravasación sanguínea al parénquima cerebral (hemorragia intraparenquimatosa) o al espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea) [6].

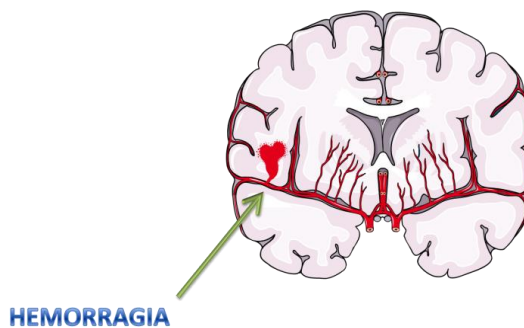


Ilustración 4. Representación de un ictus hemorrágico.

Según su etiología, el ictus isquémico puede clasificarse en base a los criterios TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) [7] en:

- Infarto aterotrombótico: presencia de estenosis igual o mayor al 50% del diámetro luminal u oclusión de una arteria extracraneal o intracraneal de gran calibre que supla la región clínicamente afectada, en ausencia de otra etiología.
- Infarto cardioembólico: presencia de fuente embolígena inequívoca (trombo o tumor intracardíaco, estenosis mitral reumática, prótesis aórtica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del

nodo sinusal, aneurisma ventricular izquierdo, infarto agudo de miocardio de menos de 3 meses de evolución, o presencia de hipocinesia cardíaca global o discinesia), en ausencia de otra etiología.

- Infarto lacunar: infarto de menos de 15 mm de diámetro en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar (síndrome motor, sensitivo, sensitivo-motor, hemiparesia ataxia, disartria mano torpe), en ausencia de otra etiología.
- Infarto de origen inhabitual: infarto de pequeño, mediano o gran tamaño, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebrobasilar, habiendo descartado origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Suele estar producido por enfermedades sistémicas (conectivopatías, infecciones, neoplasias, síndrome mieloproliferativo, alteraciones metabólicas o de la coagulación) o por otras enfermedades como disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformaciones arteriovenosas, trombosis venosa cerebral, vasculitis, migraña, etc.
- Infarto de origen indeterminado: infarto cerebral en el que tras un exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar o inhabitual, o bien coexista más de una posible etiología. En este caso se pueden subdividir en indeterminado por estudio incompleto, por más de una etiología o por causa desconocida.

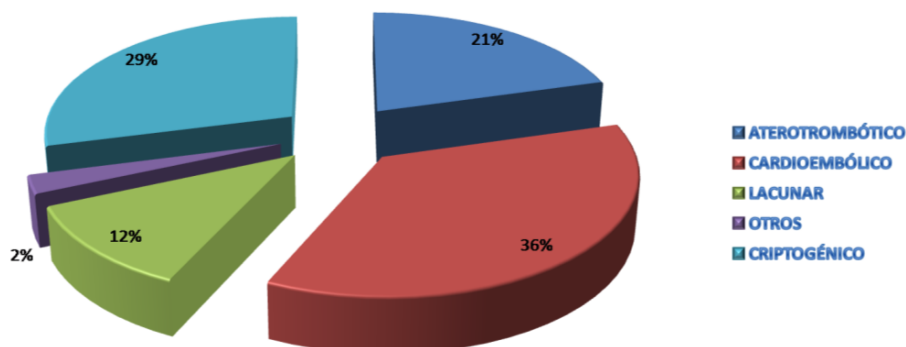


Ilustración 5. Distribución de los subtipos de ictus isquémico [8].

Según su localización clínica en base a la clasificación OCSF (*Oxfordshire Community Stroke Project*) [9], el ictus isquémico se pueden clasificar en:

- Infarto total de la circulación anterior o TACI (Total anterior circulation infarction): si cumple los criterios de:
 - a) Disfunción cerebral superior (afasia, disclaculia o alteraciones viso espaciales).
 - b) Déficit motor y/o sensitivo en al menos dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 - c) Hemianopsia homónima.
- Infarto parcial de la circulación anterior o PACI (Partial anterior circulation infarction): si cumple alguno de los criterios de:
 - a) Disfunción cerebral superior (afasia, disclaculia o alteraciones visoespaciales); o
 - b) Cuando se cumplen 2 de los 3 criterios de TACI; o

- c) Déficit motor y/o sensitivo más restringido que el clasificado como LACI (déficit limitado a una sola extremidad, o a cara y mano pero sin afectación del resto del brazo).
- Infartos lacunares o LACI (Lacunar infarction): si no existe disfunción cerebral superior ni hemianopsia y cumple uno de los criterios de:
 - a) Hemisíndrome motor puro que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 - b) Hemisíndrome sensitivo puro que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 - c) Hemisíndrome sensitivo-motor que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 - d) Hemiparesia-ataxia ipsilateral.
 - e) Disartria mano torpe u otro síndrome lacunar.
- Infartos de la circulación posterior o POCI (Posterior circulation infarction): si cumple alguno de los criterios de:
 - a) Afectación ipsilateral de pares craneales con déficit motor y/o sensitivo contralateral.
 - b) Déficit motor y/o sensitivo bilateral.
 - c) Patología oculomotora.
 - d) Disfunción cerebelosa sin déficit de vías largas ipsilaterales.
 - e) Hemianopsia homónima aislada.

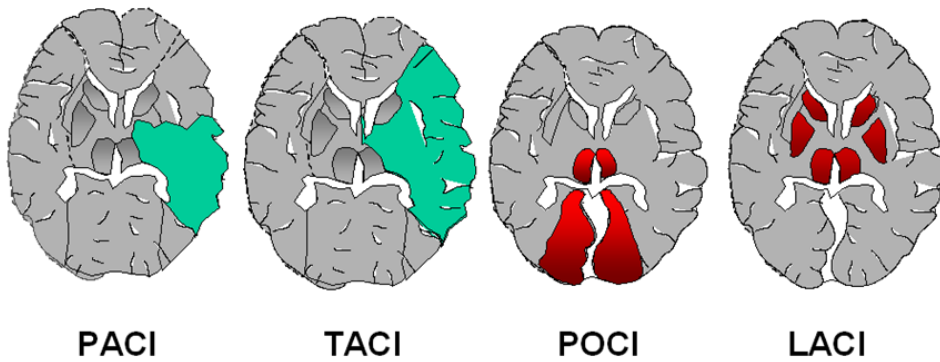


Ilustración 6. Clasificación OCSF: tipos de infartos cerebrales según su localización clínica.

Factores de riesgo vascular

Para poder llevar a cabo una adecuada prevención en el ictus es necesario conocer los factores de riesgo implicados y actuar sobre aquellos potencialmente modificables [10].

Factores de riesgo no modificables

- **Edad:** El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cerebrovascular. La incidencia del ictus aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando sus valores máximos por encima de los 65 años.

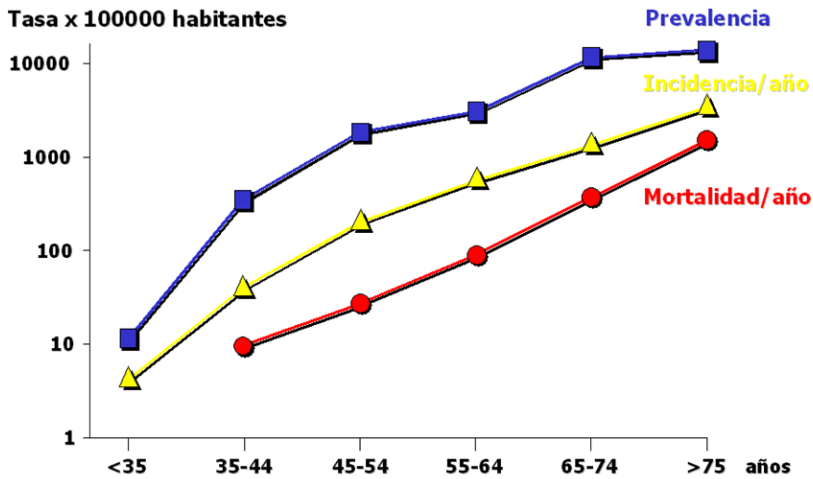


Ilustración 7. Prevalencia, incidencia y mortalidad por ictus en relación con la edad.

- Sexo: los varones tienen mayor incidencia de ictus que las mujeres.
- Grupo racial: la ateromatosis de grandes vasos afecta con mayor frecuencia a los individuos caucásicos; mientras que la patología de pequeño vaso es más frecuente en africanos y asiáticos.
- Herencia y genética: existe una predisposición familiar a padecer ictus. Es posible que se deba a la asociación de factores de riesgo fundamentales, como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la hipercolesterolemia. En ocasiones en pacientes jóvenes, el único antecedente es un familiar de primer grado afecto de ictus.

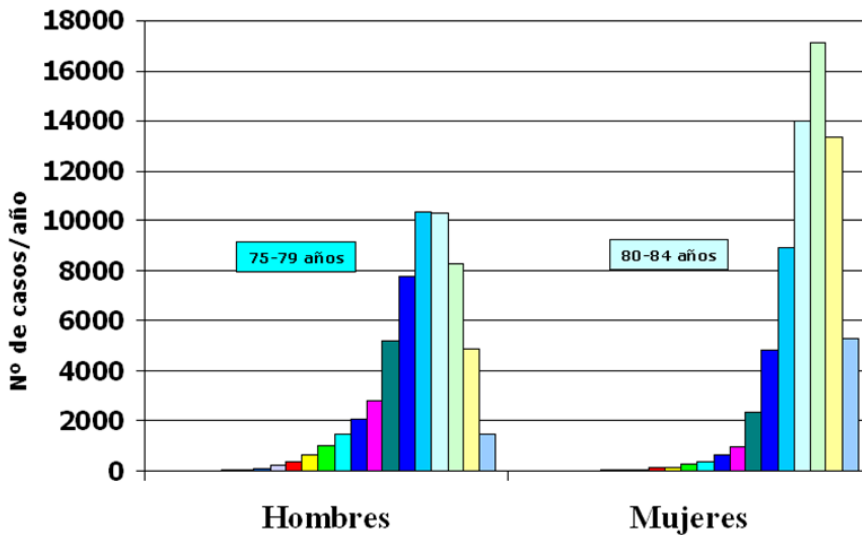


Ilustración 8. Incidencia en España de ECV en relación con el sexo (INE 2005).

Factores de riesgo modificables

- Hipertensión arterial: es el principal factor de riesgo para cualquier tipo de ictus, tanto isquémico como hemorrágico. Todos los tipos de hipertensión, tanto sistólica como diastólica o combinada, incrementan el riesgo de ictus a partir de valores moderados. Valores de tensión arterial sistólica en torno a 140-160 mm Hg o diastólica de 90-94 mm Hg incrementan el riesgo de ictus 1,5 veces.
- Cardiopatía: Las enfermedades cardíacas tienen una clara asociación con los ictus, especialmente la fibrilación auricular, las valvulopatías, el infarto de miocardio, la hipertrofia ventricular izquierda y la cardiomegalia.

- **Diabetes mellitus:** se estima que el riesgo de ictus en pacientes diabéticos aumenta 1,8 veces en varones y 2,2 veces en mujeres. La diabetes predispone al ictus isquémico debido a su influencia en el desarrollo de aterosclerosis.

FACTOR DE RIESGO	HOMBRES	MUJERES
Tabaquismo	18,8	1,4
Hipertensión objetivada	61	71,9
Diabetes	12,8	15,3
Hipercolesterolemia	18,6	26,7

Tabla 1. Prevalencia de los factores de riesgo en la población española [11, 12].

- **Hiperlipemia:** la hiperlipemia favorece el desarrollo de la ateromatosis y de la isquemia, tanto coronaria como carotídea.
- **Tabaquismo:** el consumo de cigarrillos predispone a la aparición de aterosclerosis en hombres y mujeres, con un incremento del riesgo de 2-3 veces. El tabaco facilita el espasmo arterial y el daño endotelial. Este riesgo añadido del tabaco desaparece tras cinco años de abstinencia.
- **Otros factores:** el sedentarismo, la obesidad, el ronquido nocturno, el síndrome de apneas del sueño, los anticonceptivos orales y el

consumo excesivo de alcohol también se han relacionado con un incremento del riesgo de ictus.

Otra peculiaridad importante es la asociación de diferentes factores de riesgo, ya que a medida que se van sumando, el riesgo de padecer un ictus aumenta de manera exponencial. En la gráfica 1 se resumen los resultados de un estudio en el que se valora la probabilidad de desarrollar un ictus a los 10 años, en relación con la asociación de diferentes factores de riesgo en hombres de 70 años [13]. Los datos se muestran en relación a dos niveles de presión arterial, 120 mmHg y 180 mmHg.

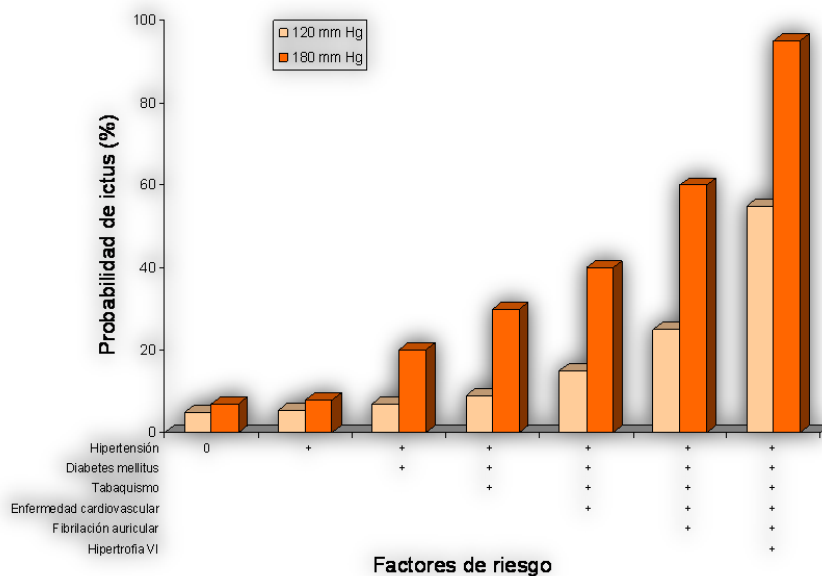


Ilustración 9. Probabilidad de desarrollar un ictus a los 10 años, en dos niveles de presión arterial. Impacto de otros factores de riesgo en varones de 70 años [14].

Fisiopatología del ictus isquémico

La isquemia cerebral se origina por la disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel suficiente capaz de interferir con la función del sistema nervioso. Este proceso resulta de una alteración en el equilibrio de numerosos factores hemodinámicos; pudiendo producir diversas alteraciones bioquímicas y metabólicas en las neuronas y en la glía que conducen a la necrosis celular [15].

Al obstruirse un vaso sanguíneo cerebral se produce un gradiente de perfusión sanguínea. La disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en una determinada zona de tejido cerebral, por debajo de 10 mL/100 g/min, produce una rápida muerte neuronal [16]. Entre este núcleo intensamente isquémico y el parénquima normalmente perfundido (FSC > 50 mL/100 g/min), existe una zona moderadamente hipoperfundida, cuya extensión depende del mejor o peor funcionamiento de la circulación colateral [17, 18]. Recientemente, estudios de tomografía por emisión de positrones (PET), han logrado diferenciar en la zona hipoperfundida dos regiones con pronóstico claramente diferenciado:

- Zona oligohémica: ligeramente hipoperfundida (FSC > 22 mL/100 g/min) en la que la transformación en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas.
- Penumbra isquémica: con una perfusión cerebral críticamente disminuida (FSC < 22 mL/100 g/min), pero en la que el consumo de oxí-

geno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (perfusión de miseria) [19, 20].

La penumbra isquémica no tiene por qué estar necesariamente rodeando zona de necrosis neuronal, sino que puede constituir por sí misma un territorio cerebral con aporte sanguíneo comprometido pero con un metabolismo energético preservado [21].

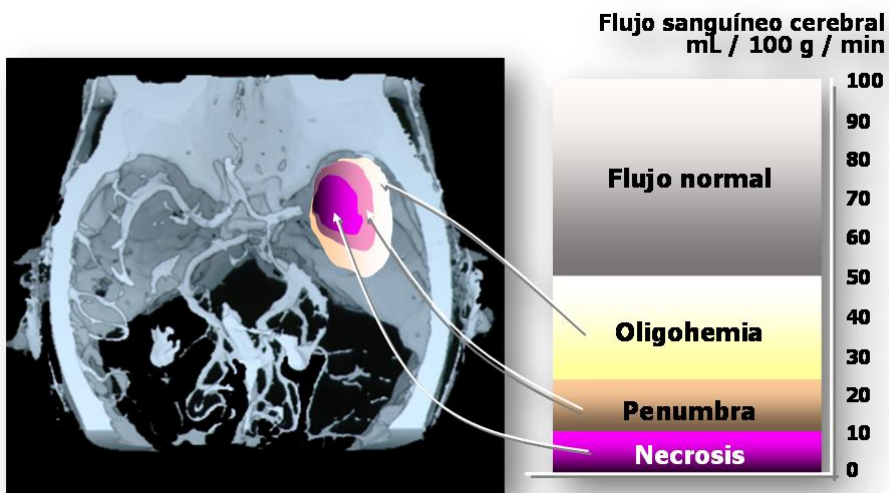


Ilustración 10. Zonas del tejido cerebral en relación al flujo sanguíneo tras la obstrucción de un vaso.

La penumbra isquémica se define como: “el tejido cerebral en el cual el flujo sanguíneo cerebral ha disminuido hasta el punto de causar silencio electrofisiológico y pérdidas pasajeras, pero recurrentes, de los gradientes de membrana y metabolitos energéticos [22]”.

En la penumbra isquémica hay alteración de la actividad funcional de las neuronas, pero se conserva una actividad metabólica mínima que preserva la integridad estructural durante algún tiempo. En esta zona el tejido resulta dañado, se altera el mecanismo de autorregulación, se mantiene parcialmente la reactividad al CO₂, la transmisión sináptica y el contenido de adenosín trifosfato (ATP) son normales y disminuye el contenido de glucosa. Esto produce la aparición de síntomas neurológicos, pero no de daños irreversibles [15]. Las neuronas de la penumbra isquémica pueden sobrevivir y recuperarse cuando se mejoren las condiciones hemodinámicas y se restaure el flujo sanguíneo cerebral que aporte de nuevo la glucosa y el oxígeno necesarios [23]. Este hecho constituye la base para el tratamiento de la isquemia cerebral.

La cascada isquémica neuronal

La falta de ATP a causa de la hipoxia origina el fallo de las bombas de Na⁺ y de K⁺, produciendo una rápida depleción de K⁺ intracelular que condiciona la despolarización neuronal, y la consiguiente apertura de canales de Ca⁺⁺ voltaje dependientes. Esto conlleva a un incremento de Ca⁺⁺ intracelular que puede duplicar la concentración inicial, contribuyendo a la despolarización de la membrana [24].

El fallo energético y la despolarización de la membrana neuronal condicionan el aumento en la liberación de glutamato (GLU) y otros aminoácidos excitadores [25]. El GLU liberado estimula receptores de membrana ionotrópicos (principalmente AMPA y NMDA) y metabotrópicos. La estimulación de

estos receptores pone en marcha una cascada isquémica que llevará a la muerte celular [24].

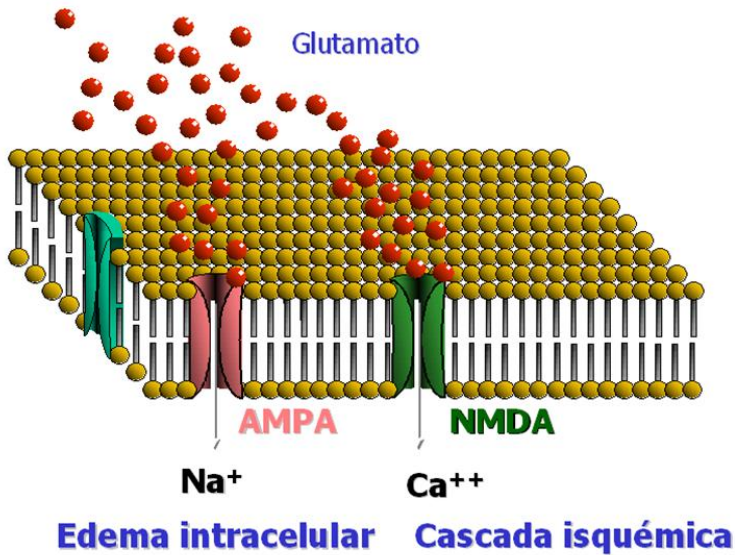


Ilustración 11. Excitotoxicidad por GLU. La activación de los receptores AMPA produce la entrada de Na^+ (arrastrando agua) resultando en edema intracelular. La activación de los receptores NMDA produce la entrada de Ca^{++} desencadenando la cascada isquémica.

El aumento de $[\text{Ca}^{++}]_i$ (intracelular) es clave en los procesos que conducen al daño cerebral irreversible. Su elevación intracelular activa una serie de enzimas (proteínquinasas, proteasas, endonucleasas, proteínfosfatasa y sintasa de óxido nítrico –NOS-) y condiciona la expresión de varios genes de respuesta [26].

Dentro de esta cascada isquémica se van a producir también especies reactivas de oxígeno (ROS), que ocasionan la alteración de algunos constituyen-

tes celulares como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; al sobrepasar la capacidad antioxidante de las neuronas.

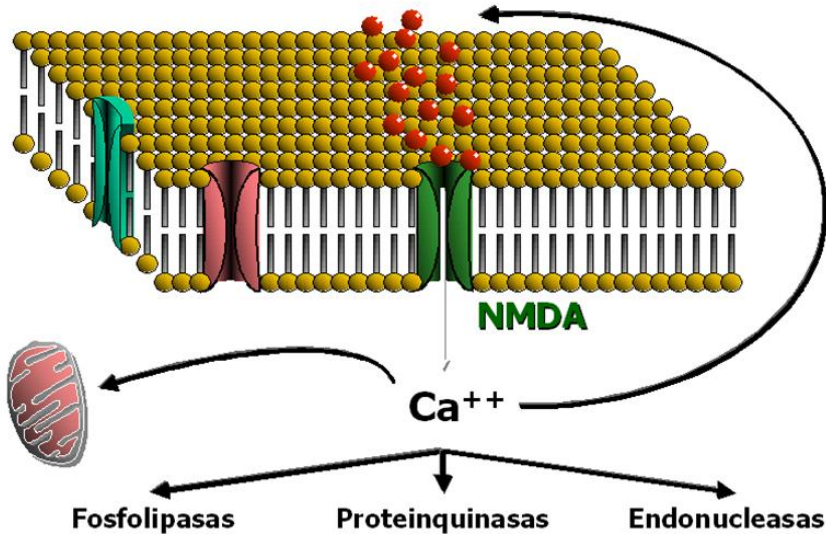


Ilustración 12. Daño celular por Ca^{++} . La elevación del Ca_i^{++} interrumpe la producción de ATP, afecta a la estabilidad de fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos y favorece el incremento de GLU extracelular; propagando la excitotoxicidad.

La activación de los receptores NMDA y la entrada de Ca_i^{++} estimula la NOS y se produce un aumento de la síntesis de óxido nítrico (NO). El aumento de NO por la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) origina una lesión neuronal inmediata, mientras que la iNOS (inducible) contribuye al daño neuronal retardado. El NO producido por eNOS (endotelial) actúa como neuroprotector, induciendo vasodilatación y el mantenimiento del FSC regional [27].

La toxicidad del NO depende de su reacción con el O_2^- . La formación de NO en presencia de un exceso de O_2^- origina el anión $ONOO^-$; causa directa de la lisis neuronal al reaccionar con grupos sulfhidrilo, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [28].

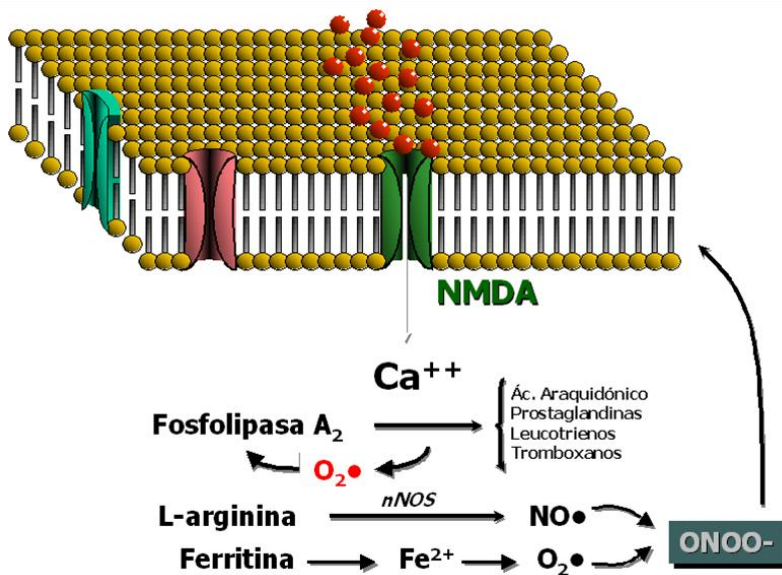


Ilustración 13. Generación de ROS. La fosfolipasa A_2 está sobreactivada por la entrada de Ca_{++} por el receptor NMDA, generando O_2^- . Este receptor también estimula la nNOS, originando $ONOO^-$.

Durante la isquemia cerebral, además del GLU, aparecen otros neurotransmisores en el espacio vascular; principalmente la GLY y el GABA. La GLY es coestimulador del receptor NMDA [29], mientras que el GABA ejerce una neurotransmisión inhibitoria.

El GABA se sintetiza, en parte, a partir del GLU. Durante la isquemia cerebral se produce un aumento de su síntesis y liberación al espacio extravascu-

lar, donde llegan a alcanzarse concentraciones 250 veces más altas que en condiciones fisiológicas. Desempeña una función neuroprotectora, existiendo datos experimentales que así lo demuestran [30].

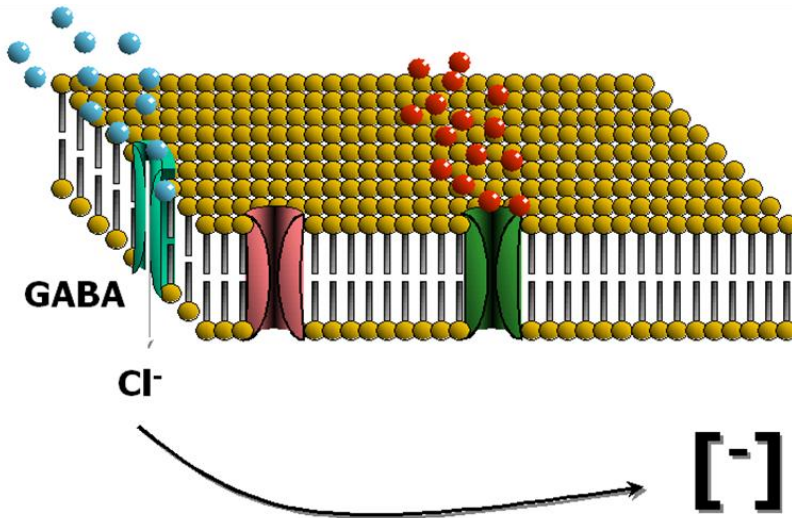


Ilustración 14. Efecto neuroprotector del GABA. El GABA provoca la entrada de Cl^- que incrementa la concentración de cargas negativas en la célula, favoreciendo la repolarización.

La muerte neuronal en la zona de penumbra isquémica también es resultado de procesos de apoptosis. La lesión del ADN por las endonucleasas o las ROS inicia un mecanismo autodestructivo produciendo alteraciones de la expresión génica [31]. Reducciones moderadas del ATP mitocondrial originan la liberación de caspasas, citocromo c y del factor de inducción de la apoptosis, que actúan como iniciadores de la apoptosis neuronal [32].

Al mismo tiempo, la apoptosis se relaciona también con una forma de neuroprotección fisiológica como es la tolerancia isquémica [33]. En las neuronas del área de penumbra isquémica la estimulación del receptor NMDA y el aumento de $[Ca^{++}]_i$ inducen la expresión de genes de respuesta inmediata que pueden regular la síntesis proteica en otros genes efectores. Esta síntesis proteica (proteínas de estrés, factores de crecimiento neuronal, factor de necrosis tumoral alfa-TNF- α -) puede ejercer un papel promotor de la supervivencia y recuperación neuronal, o bien activar la muerte celular programada [34].

La glía en la isquemia cerebral

Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el ictus, tanto en el establecimiento de la lesión definitiva como en la reparación del tejido.

En condiciones fisiológicas, los astrocitos controlan la acción neurotransmisora del GLU mediante su recaptación a través de transportadores. Estos transportadores utilizan el gradiente de membrana del Na^+ para conducir el GLU al interior del astrocito. El GLU es convertido en GLN, que será reutilizada por las neuronas para la síntesis de GLU y GABA.

Durante la isquemia cerebral el primer cambio morfológico que se observa es el edema de los astrocitos. Este edema resulta del fallo energético que origina la despolarización y la apertura de varios canales iónicos, dependientes o no del GLU, con la consiguiente entrada de Na^+ y agua [35].

El edema de los astrocitos, la disminución de los transportadores GLT (transportadores de GLU) y GLAST (transportadores de GLU-aspartato), el

ácido araquidónico, radicales libres, ácido láctico, y la presencia de concentraciones elevadas de NO son los factores causantes de la disminución de recaptación de GLU.

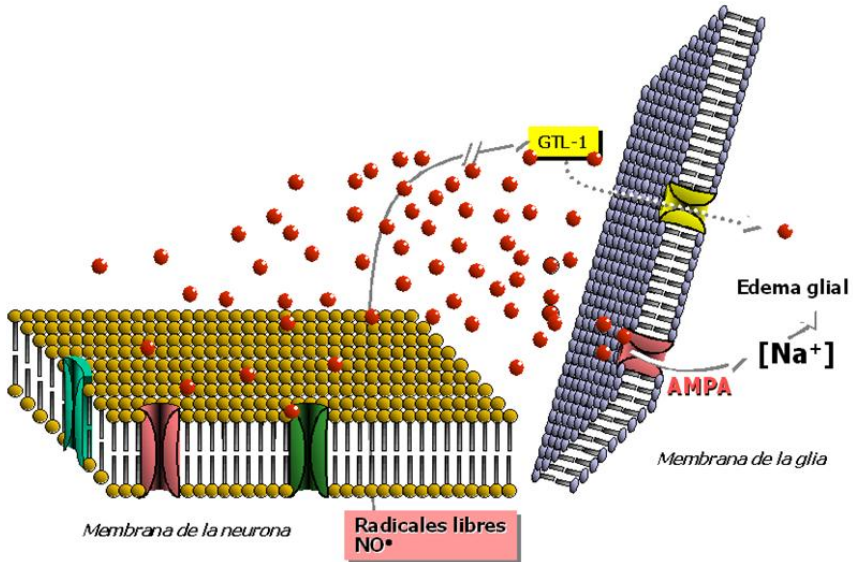


Ilustración 15. Recaptación del GLU. Durante la isquemia cerebral se produce un bloqueo del receptor GLUT-1 (responsable del 90% de la recaptación en condiciones fisiológicas) aumentando el GLU extracelular. El exceso de GLU activa los receptores AMPA de la glía provocado la entrada de sodio y agua.

La microglía también contribuye al daño isquémico mediante la producción de citoquinas, NO y otros radicales libres [36].

En la oligodendroglía, la disminución energética origina una pérdida de los gradientes iónicos que revierten el funcionamiento de algunas bombas intercambiadoras de Na⁺ y de Ca⁺⁺; con la consiguiente acumulación de ambos iones en el interior de la célula.

Las células gliales que sobreviven al episodio isquémico sufren un proceso de hipertrofia y proliferación, fundamentalmente de astrocitos, denominado gliosis reactiva, y que se ha relacionado con mecanismos de neurorreparación y neuroprotección.

Los astrocitos constituyen una de las fuentes más importantes de factores de crecimiento, fundamentalmente del factor de crecimiento neuronal (NGF), del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); que desempeñan un papel muy importante en la tolerancia isquémica [37].

Alteraciones microcirculatorias en la isquemia cerebral

La isquemia y la posterior reperfusión inducen una respuesta inflamatoria, iniciada en la microcirculación, que contribuye a la destrucción celular.

Las células endoteliales, principalmente, y las neuronas, astrocitos y microglía de la periferia de la zona isquémica, se activan para iniciar una respuesta inflamatoria por medio de la liberación de citoquinas [38].

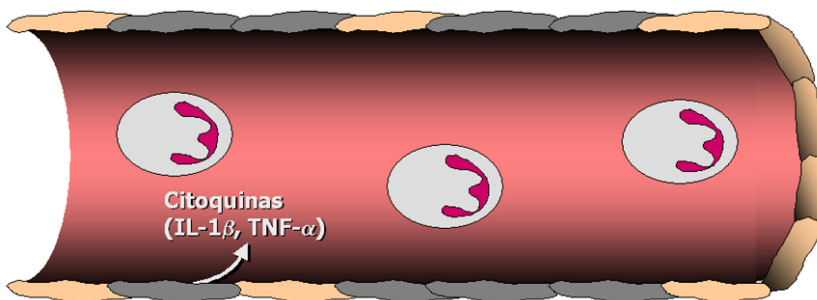


Ilustración 16. Inicio de la inflamación en la microcirculación. La activación de IL-1 β y el TNF- α , inicia la inflamación precoz en la isquemia cerebral.

La interleuquina 1 β (IL-1 β) y el TNF- α son las dos citoquinas que inician la repuesta con una activación precoz y transitoria [38]; induciendo una segunda respuesta inflamatoria más persistente, mediada por la IL-6 e IL-8. Éstas desempeñan un papel importante en el desarrollo de reactantes de fase aguda, incluyendo la fiebre, la proteína C reactiva (PCR) y el fibrinógeno [39]; y en la liberación de adhesinas (selectinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas), que originan la agregación leucocitaria y posteriormente su adherencia a elementos conjuntivos de la pared vascular.

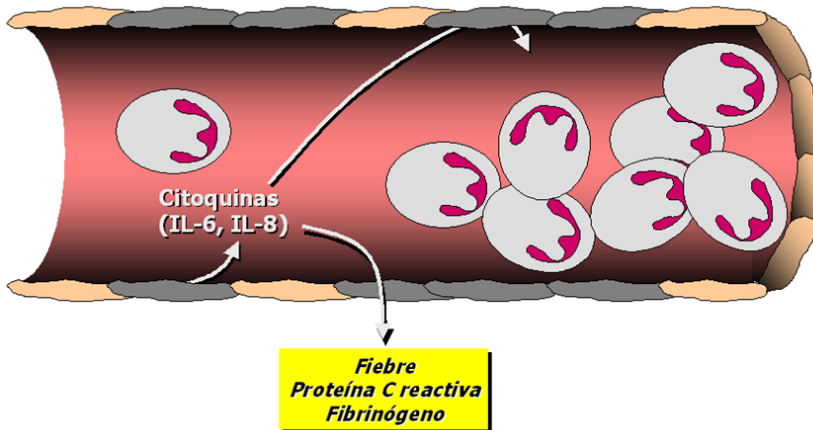


Ilustración 17. Segunda respuesta inflamatoria en la microcirculación. La IL-1 β y el TNF- α inducen una segunda respuesta inflamatoria más persistente mediada por la IL-6 e IL-8; desarrollando reactantes de fase aguda.

La IL-8 activa a las integrinas, mientras que la IL-6 activa a las selectinas y a la superfamilia de las inmunoglobulinas [40]. Las selectinas (L-selectina,

P-selectina y E-selectina) son glicoproteínas que contribuyen a la interacción inicial de los leucocitos y las células endoteliales en la periferia del infarto, con una acción transitoria y reversible.

Las principales moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas son las moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), las moléculas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y las moléculas de adhesión celular plaqueta endotelio 1 (PECAM-1).

Las integrinas también intervienen en la adhesión intracelular, así como en la interacción de estas células con elementos de la matriz extracelular; con acción más tardía. Como consecuencia de la activación de las adhesinas se origina un reclutamiento de leucocitos, y posteriormente su adhesión y agregación a la pared vascular, causando la obstrucción de la microcirculación y del fenómeno del no reflujo.

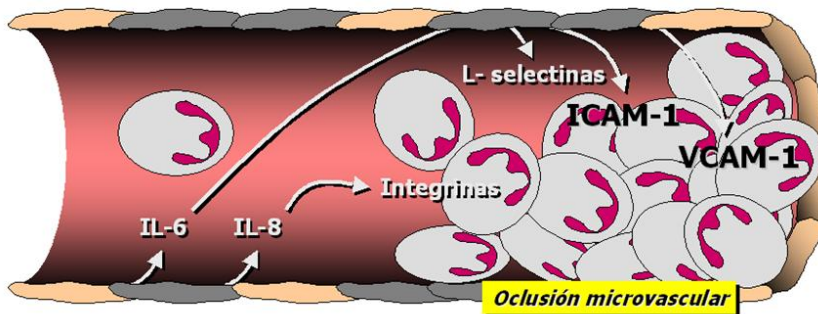


Ilustración 18. Las interleuquinas 6 y 8 son responsables de la liberación de moléculas de adhesión celular, como las integrinas, las selectinas, y las moléculas miembros de la familia de las inmunoglobulinas (ICAM-1 y VCAM-1), que originan la agregación de leucocitos y su adhesión al tejido conjuntivo de la pared vascular, lo que contribuye a la oclusión microvascular.

Las MMP son una familia de enzimas proteolíticas que se encargan del remodelado de la matriz extracelular y que, en conjunto, pueden degradar todos sus constituyentes.

La MMP-2 y la MMP-9 están implicadas en la isquemia cerebral [41], produciendo la rotura de la barrera hematoencefálica y consiguientemente, el desarrollo del edema vasogénico que facilita la transformación hemorrágica del infarto [42].

La IL-6 y el TNF- α son citoquinas que pueden expresar MMP-9. La región promotora del gen de la MMP-9 contiene una zona de unión para la proteína activadora 1 (AP-1) y para el factor nuclear κ B (NF- κ B) que responde a numerosos estímulos inflamatorios; y los genes de respuesta inmediata forman el heterodímero AP-1 que activa el gen MMP-9 [43].

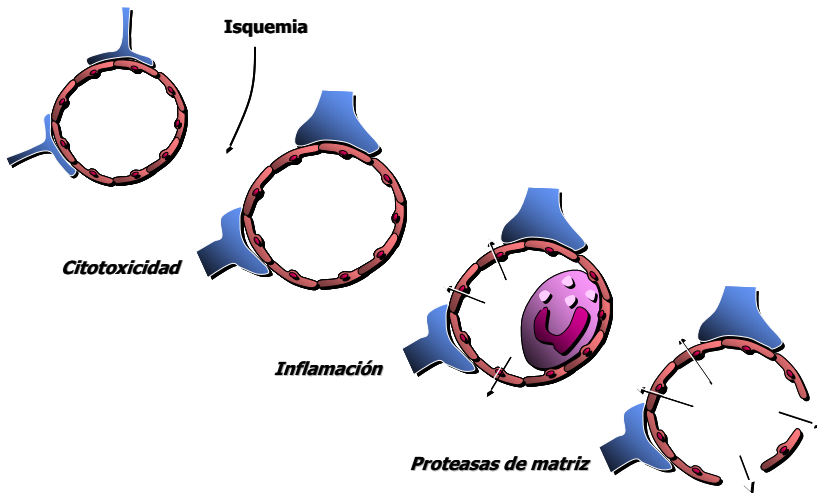


Ilustración 19. Disrupción de la barrera hematoencefálica. Las MMP empleadas por los leucocitos para migrar a través del endotelio provocan una desestructuración de la barrera hematoencefálica, aumentando la permeabilidad vascular y contribuyendo a la formación de edema vasogénico.

Los leucocitos acumulados y adheridos por acción de las citoquinas en la isquemia cerebral, utilizan la producción de MMP para migrar a través del endotelio, desestructurar la barrera hematoencefálica y contribuir a la producción de edema.

La endotelina (ET) liberada, fundamentalmente por el endotelio vascular aunque también por neuronas y células gliales, aumenta en la isquemia cerebral debido a la activación de los receptores ET-A presentes en los vasos cerebrales [44]; de forma que se produce una acción vasoconstrictora potente y mantenida.

Otros factores como los metabolitos del ácido araquidónico y algunos radicales libres tienen también efectos vasoconstrictores.

Además de estos factores bioquímicos, el edema de los astrocitos perivasculares contribuye a la reducción del calibre de la microcirculación [45].

Marcadores moleculares de utilidad diagnóstica y pronóstica

Los mecanismos bioquímicos de neurotoxicidad e inflamación resultan de utilidad como marcadores asociados a signos precoces de isquemia, deterioro neurológico, volumen de infarto, transformación hemorrágica y con eficacia del tratamiento trombolítico.

El edema citotóxico, originado como consecuencia de la activación de los receptores AMPA por los aminoácidos excitatorios, es responsable de los signos precoces que se pueden identificar en la tomografía computerizada (TC). Otros factores, como los diferentes mecanismos inflamatorios y la dis-

rupción de la barrera hematoencefálica, son responsables del edema vasogénico.

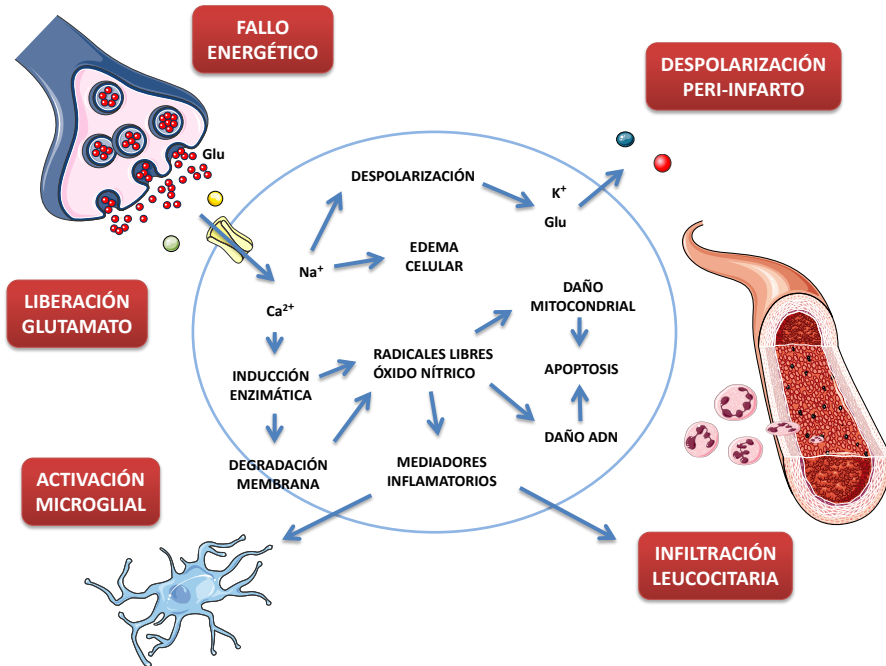


Ilustración 20. Principales mecanismos implicados en la isquemia cerebral.

Existe una asociación secuencial entre los marcadores de excitotoxicidad (GLU), inflamación (IL-6 y TNF- α) y ruptura de la barrera hematoencefálica (MMP-9) según la intensidad de los marcadores precoces de isquemia [46].

Uno de los mecanismos responsables del deterioro neurológico precoz es la transformación del tejido isquémico periférico a la zona de infarto (penumbra isquémica) en tejido necrótico.

El GLU es el marcador bioquímico predictivo más potente de progresión del infarto [47], aunque también se ha visto que las concentraciones elevadas de GLY, así como los niveles bajos de GABA en plasma, son predictores del deterioro neurológico que se produce en las primeras 48 horas [48].

Existe una fuerte relación entre los depósitos de hierro, una fuente de radicales libres, y el deterioro neurológico [49], al igual que con los marcadores moleculares de inflamación, como la IL-6 [50-52].

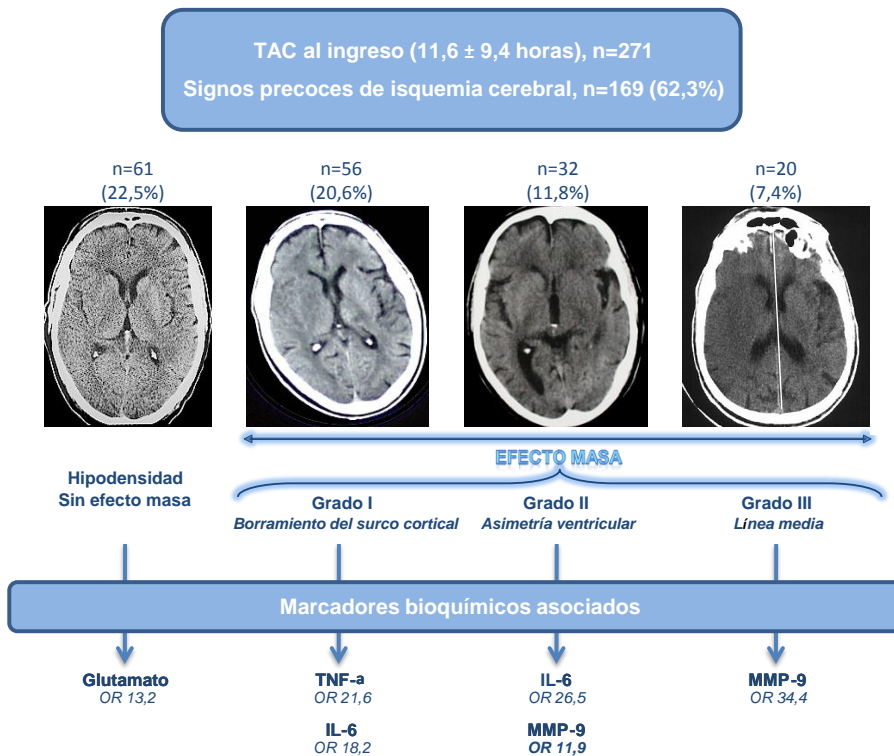


Ilustración 21. Asociación de signos precoces de isquemia cerebral con marcadores bioquímicos.

El volumen final del infarto es consecuencia de la interacción de factores vasculares, hemodinámicos y bioquímicos. Algunos marcadores moleculares poseen un efecto neuroprotector, como el GABA y la IL-10, mientras que otros, como el ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , IL-6, GLU, ferritina, MMP-9 y NO⁻ se asocian con un mayor volumen del infarto [53].

La transformación hemorrágica de un infarto cerebral es una complicación evolutiva con implicaciones clínicas significativas. El tamaño de la lesión, la hipertensión arterial, el tratamiento con anticoagulantes, la edad, la presencia de signos precoces en neuroimagen o la hiperglucemia se asocian con un mayor riesgo de transformación hemorrágica [54, 55]. Parece que la causa de la transformación hemorrágica es la pérdida de la integridad de la lámina basal de la microcirculación cerebral debido a la isquemia [56]. La activación de las MMPs en modelos animales produce el deterioro de los componentes de la lámina basal, como la laminina, el colágeno y la fibronectina, originando la transformación hemorrágica [57]. Además, la concentración de MMP-9 es tres veces mayor en aquellos pacientes que presentan transformación hemorrágica [58]. Asimismo, concentraciones elevadas de fibronectina celular (cFn) pueden predecir transformación hemorrágica en aquellos pacientes que reciben tratamiento trombolítico [59].

El tratamiento trombolítico con r-tPA es el único fármaco que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del ictus isquémico. La respuesta a dicho tratamiento no es homogénea, y la mayor complicación que se produce es la transformación hemorrágica. Los niveles plasmáticos de IL-6, TNF- α y MMP-9 obtenidos basalmente se relacionan con la eficacia del tratamiento trom-

bolítico y con la incidencia de complicaciones como la transformación hemorrágica [53].

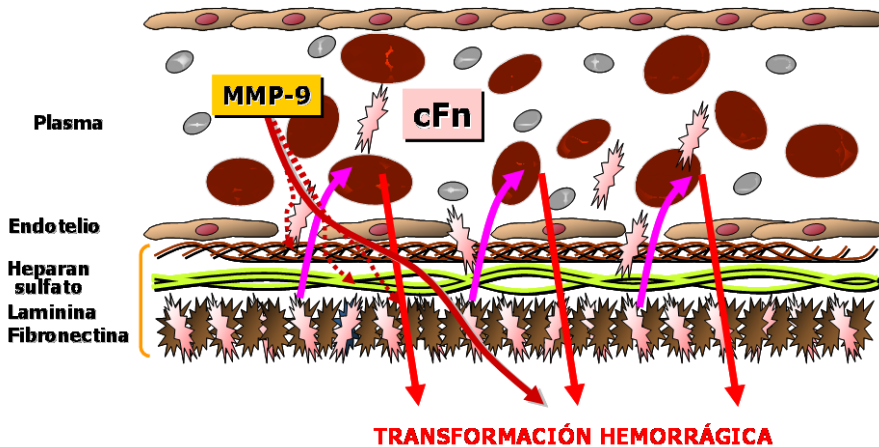


Ilustración 22. Mecanismos moleculares de transformación hemorrágica en la isquemia cerebral.

Exploraciones vasculares en el ictus

Ultrasonografía

El uso clínico de los ultrasonidos en el diagnóstico vascular comenzó a mediados de la década de los años 60 con la utilización de un doppler de emisión continua desarrollado por la Universidad de Washington denominado “Dopotone”. Desde ese momento se han experimentado importantes avances en este campo, entre los que destacan: la combinación de la ecografía modo B y el efecto doppler (base del dúplex scan actual) y la incorporación del color a finales de la década de los 70 [60].

Doppler de emisión continua

Es una técnica histórica [61, 62] y la más subjetiva dentro de las técnicas no invasivas de los troncos supraórticos que aún tiene validez.

Ofrece una información preliminar que puede ser ampliada por técnicas sucesivas y es importante en la valoración global de la repercusión hemodinámica de lesiones en los troncos supraórticos (TSA).

La alta energía del Doppler continuo, el no presentar efecto de “aliasing”, así como la comodidad de manejo de un transductor tipo lápiz son sus principales ventajas. El gran inconveniente es que debe detectar un vaso que no se ve y que por tanto no es posible conocer el ángulo de incidencia de los ultrasonidos con el mismo; lo que confiere a la exploración un marcado carácter cualitativo. El doppler pulsado resuelve este problema emitiendo pulsos cortos de ultrasonidos de forma regular; permitiendo localizar la señal a una profundidad concreta.

Ultrasonografía duplex o eco-Doppler.

Constituye el procedimiento diagnóstico más rápido, no invasivo, económico y fiable para detectar enfermedad estenosante de la arteria carótida interna (ACI) extracraneal. Permite el estudio hemodinámico de la estenosis y el morfológico de la placa de ateroma. Se combina un ecógrafo modo B a tiempo real con un instrumento de ultrasonidos y análisis de la señal doppler.

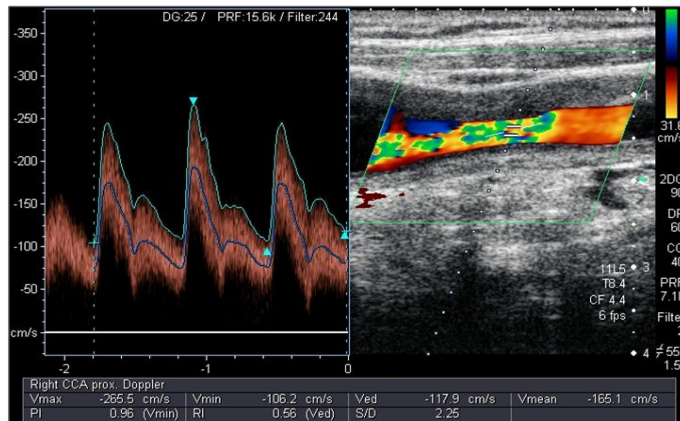


Ilustración 23. Imagen de la arteria carótida mediante eco-doppler.

La técnica fue descrita en los años 70 [63] y desde entonces la mejora tecnológica y la especialización de los exploradores ha situado al ecodoppler en un test de primera línea en el diagnóstico no invasivo de los troncos supraórticos en general y de la estenosis de ACI en particular.

El duplex logra la visualización del vaso explorado aportando detalles acerca de la morfología del mismo y permite el conocimiento del ángulo de incidencia con lo que posibilita el cálculo de la velocidad de flujo que se relaciona con el estudio hemodinámico objeto del estudio.

Los criterios diagnósticos para la gradación de la estenosis de ACI están basados en el análisis espectral doppler, es decir, en la determinación de la amplitud de todas las frecuencias presentes en la señal doppler y su representación gráfica: velocidad (cm/s.), tiempo en el eje de abscisas y amplitud indicada por la intensidad de escala de grises. Existen varios parámetros a

valorar en el análisis espectral, pero de acuerdo con distintos estudios [64, 65] es básica la valoración de tres de ellos :

- Velocidad sistólica máxima: si supera los 230 cm/s. es indicativo de estenosis superior al 70 % de la ACI.
- Velocidad diastólica máxima: es un parámetro útil para distinguir entre estenosis inferiores o superiores al 70 %, según sea inferior o superior a 100 cm/s.
- Ventana: cuando el flujo es turbulento (indicativo de estenosis) se registra una gran variedad de rangos de frecuencias y amplitudes que gráficamente queda representado por una ocupación de puntos grises por debajo del contorno de la curva, a diferencia del flujo laminar normal, donde el área por debajo del pico sistólico es clara (ventana).

Los criterios de análisis espectral han sido revisados en diversas ocasiones [66,67], de forma que en la actualidad las estenosis carotídeas extracraneales se clasifican en varios grupos [68].

GRADO DE ESTENOSIS	PARÁMETROS PRIMARIOS		PARÁMETROS SECUNDARIOS	
	VSM ACI (cm/s)	ESTIMACIÓN DE PLACA	RATIO ICA/CCA	VDM ACI (cm/s)
Normal	< 125	Ninguna	< 2	< 40
< 50%	< 125	< 50	< 2	< 40
50-69%	125-230	≥ 50	2-4	40-100
≥ 70%	> 230	≥ 50	> 4	> 100
Suboclusión	Muy alto, muy bajo	Visible	Variable	Variable
Oclusión	Indetectable	No lumen	No aplicable	No aplicable

Tabla 2.Criterios diagnósticos de la Sociedad de Radiólogos.VS-VD: velocidad sistólica, diastólica[68].

En los últimos años la incorporación del eco-Doppler color ha permitido obtener una imagen de relleno del vaso; que conlleva a una mejor visualización del contorno y morfología de la placa. Asimismo, identifica más claramente que el dúplex convencional, en las exploraciones de la bifurcación carotídea la zona divisoria entre el flujo anterógrado y el retrógrado. Facilita también la identificación de elongaciones arteriales, de irregularidades en las placas hipocogénicas y la identificación de obliteraciones arteriales.

La fiabilidad de este método depende fundamentalmente del explorador y una vez superada la curva de aprendizaje, la sensibilidad y especificidad puede llegar al 99% y 84 % [65] respectivamente; de tal forma que algunos autores [69] obvian la arteriografía para el diagnóstico de grupos concretos de distribuciones lesionales (sensibilidad y especificidad del 100 %).

En cuanto a las limitaciones del eco-Doppler se dice que en aproximadamente un 10 % de los casos la exploración no puede realizarse de manera satisfactoria por distintos motivos siendo los más importantes: las calcificaciones extensas, los bucles arteriales, los cuellos cortos, pacientes obesos o bifurcaciones carotídeas altas. En estos casos y en los últimos tiempos [70, 71] se han incorporado productos de contraste para ecografía que mejoran la fiabilidad de las exploraciones; llegando en casos determinados a no hacer necesaria la práctica de la arteriografía en casos de baja fiabilidad de la exploración basal como en el caso del diagnóstico de confirmación de oclusión carotídea [72].

Doppler transcraneal

El Doppler transcraneal permite conocer el estado de la circulación colateral intracerebral y realizar estudios de reactividad vasomotora con CO₂ o acetazolamida para conocer la reserva hemodinámica cerebral pudiendo de esta manera una mejor selección del paciente de riesgo. También permite, indirectamente, el estudio del grado de estabilidad de la placa mediante la detección de microembolias.

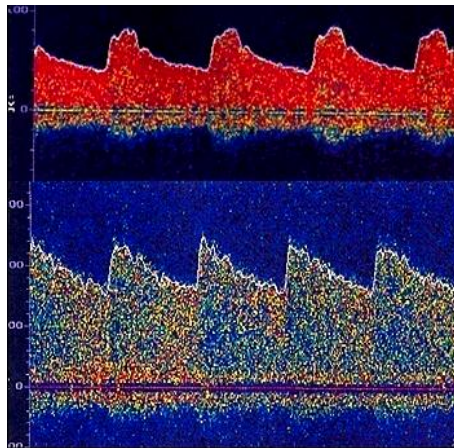


Ilustración 24. Detección de microembolias mediante Doppler transcraneal.

Habitualmente en esta técnica se manejan 3 ventanas acústicas: la temporal, la transorbitaria y la suboccipital que permiten la insonación de la arteria cerebral media, arteria cerebral anterior, arteria cerebral posterior (ACP), segmento intracraneal de la ACI y las arterias comunicantes en el caso de la ventana temporal, la arteria oftálmica y el sifón carotídeo en la ventana or-

bitaria y las arterias vertebrales y tronco basilar en la ventana suboccipital [73].

El papel desempeñado por el doppler transcraneal en el diagnóstico del ictus isquémico de origen carotídeo es fundamentalmente a través de la medición de la hemodinámica cerebral aportando información tanto del mecanismo del ictus en pacientes sintomáticos, y valorando el riesgo de infarto por mecanismo hemodinámico en pacientes asintomáticos ante situaciones determinadas como pueden ser la hipotensión, la bradicardia o la deshidratación [74].

Arteriografía

Angiografía convencional

La arteriografía de TSA ha sido el patrón de referencia del resto de exploraciones del segmento arterial. De los 3 métodos empleados para la realización de esta técnica: la arteriografía convencional, la angiografía de sustracción digital intravenosa y la angiografía de sustracción digital intraarterial; es esta última la que obtiene mayor calidad en las imágenes y disminuye los riesgos de la exploración. Se considera la técnica de referencia en la medición del grado de estenosis.



Ilustración 25. Arteriografía mostrando estenosis de la ACI.

Esta técnica aporta datos en 3 sentidos:

- Diagnóstico funcional: dada la anatomía de la circulación encefálica (sistemas de suplencia) la valoración global de la misma es de gran interés y permite planear de forma más adecuada la estrategia terapéutica.
- Diagnóstico de extensión: la información abarca todo el territorio posible causante del cuadro patológico.
- Diagnóstico morfológico: aporta datos fundamentalmente sobre la presencia o ausencia de úlceras en la placa.

La arteriografía de TSA añade a la morbilidad derivada de la punción arterial (hematomas, pseudoaneurismas) y a la inyección de contraste radiográfico un porcentaje de complicaciones neurológicas que pueden llegar al 1,2% del total de exploraciones.

Angio-TC

La angiografía-TC detecta de manera precisa la presencia de calcio, si bien presenta menos resolución espacial que la arteriografía convencional y necesita gran cantidad de contraste no dando información de toda la extensión de la ACI. Su fiabilidad aún está por determinar puesto que son escasas las series comparativas que demuestren su utilidad [75, 76].

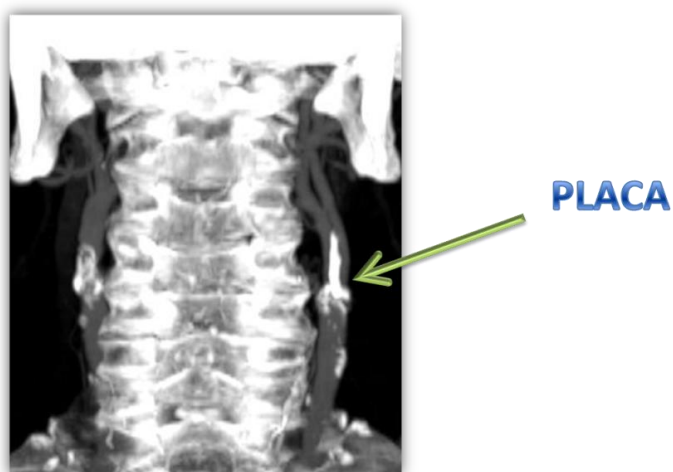


Ilustración 26. Angio-TC demostrando la presencia de estenosis de la ACI.

Angio-RM

Otra técnica no invasiva es la resonancia magnética (RM), que ofrece la posibilidad de estudios combinados de parénquima y vascularización cerebral.

Desde su introducción en humanos en la década de los 80 su crecimiento ha sido exponencial y con la introducción de técnicas de angio-RM, el diagnóstico de la enfermedad arterial oclusiva tanto extra como intracraneal ha experimentado importantes avances. En el estudio concreto de la bifurcación carotídea series comparativas publicadas han demostrado unos resultados satisfactorios respecto al dúplex y la arteriografía [77, 78].

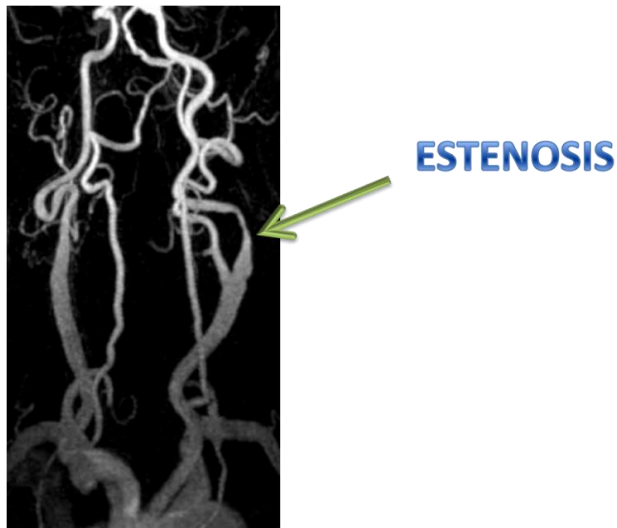


Ilustración 27. Imagen de angio-RM mostrando estenosis de la ACI.

Aterosclerosis

La aterosclerosis es un fenómeno patológico caracterizado por una respuesta inflamatoria proliferativa de la pared vascular ante diferentes agentes lesivos, en el que se acumulan lípidos y elementos fibrosos. Se ven afectadas las arterias de calibre mediano y grande, tales como la aorta, arterias femorales, carótidas, cerebrales, coronarias y renales; principalmente en la capa íntima.

Las lesiones ateroscleróticas se inician en la infancia progresando de manera crónica y asintomática a lo largo de los años, pudiendo, tardíamente, provocar sintomatología clínica como resultado de una reducción crónica o aguda (aterotrombosis) de la luz arterial; siendo la principal responsable de enfermedad cardiovascular y cerebrovascular.

FACTORES CON COMPONENTE GENÉTICO	FACTORES AMBIENTALES
Niveles elevados de LDL/VLDL	Dieta alta en grasas
Niveles reducidos de HDL	Tabaquismo
Niveles elevados de lipoproteínas (a)	Niveles bajos de antioxidantes
Elevada presión sanguínea	Falta de ejercicio
Niveles elevados de homocisteína	Agentes infecciosos
Historia familiar	
Diabetes y obesidad	
Niveles elevados de factores hemostáticos	
Depresión y otras enfermedades del comportamiento	
Sexo (hombre)	
Inflamación sistémica	
Síndrome Metabólico	

Tabla 3. Principales factores de riesgo de la aterosclerosis [79].

La aterosclerosis presenta una etiología compleja en la que interactúan numerosos factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales [80, 81], con efectos aditivos [82].

Patogenia

Inicio de la lesión: la estría grasa

Las primeras lesiones ateroscleróticas, macroscópicamente visibles, son las estrías grasas. Se pueden manifestar en la aorta y en la arterias coronarias durante las primeras décadas de vida; consistiendo en una acumulación de lípidos en la íntima vascular [83].

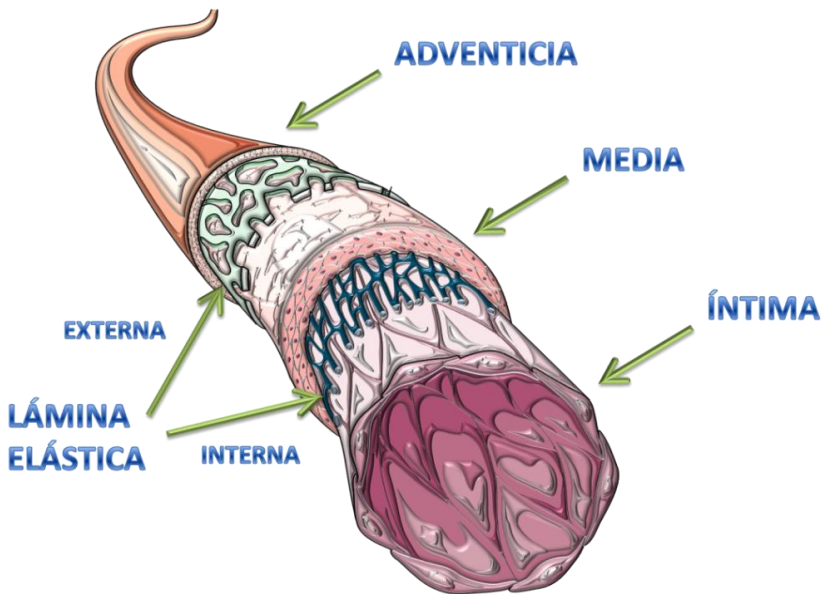


Ilustración 28. Estructura de un vaso sanguíneo normal.

El primer factor que determina la formación de la estría grasa es el transporte de lipoproteínas de baja densidad (LDL) hacia la pared vascular. Las LDL son lipoproteínas muy ricas en colesterol, que provienen en mayor parte del metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); y su función básica es la distribución del colesterol a los diferentes tejidos. Las LDL son transportadas rápidamente a través del endotelio y se unen a los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular [84]. Los proteoglicanos tienen una elevada capacidad de alterar y retener las LDL en la íntima, contribuyendo a la acumulación lipídica y al inicio de la formación de la estría grasa [85].

Debido al estado de estrés oxidativo provocado por la disfunción endotelial, las LDL retenidas en el espacio subendotelial son oxidadas [86]. Estas LDL_{ox} (oxidadas) son altamente inflamatorias y citotóxicas. Su acumulación motiva la activación de una respuesta inflamatoria provocando la atracción de linfocitos-T y monocitos hacia la lesión, que se convertirán en macrófagos una vez dentro de la íntima [87, 88]. Además de las LDL modificadas, la homocisteína, la angiotensina II (AII) y productos microbianos también inducen inflamación en la zona de la lesión [89].

Las LDL_{ox} inducen la producción, por parte de las células endoteliales y células de músculo liso (CML), de diferentes activadores de monocitos y linfocitos-T, como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) [90]. La expresión de MCP-1 y otros genes inflamatorios están bajo el control del factor de transcripción NF- κ B [91]. La activación de este factor puede desempeñar un papel clave desde las fases tempranas de la formación de la

placa, pues se encuentra de forma activa en las lesiones ateroscleróticas [92, 93].

Las LDL oxidadas y otros factores proinflamatorios, como la IL-1, la trombina y el TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión, que promueven la adhesión de los leucocitos (monocitos y linfocitos-T) al endotelio, y del factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) [94].

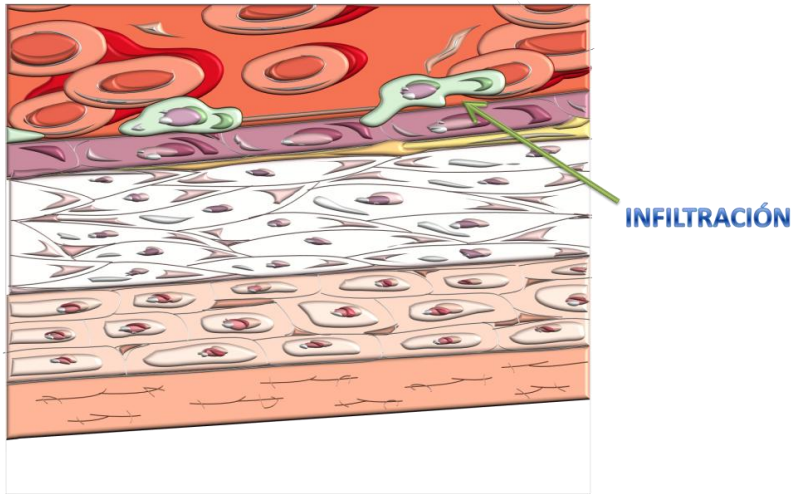


Ilustración 29. Inicio de la lesión aterosclerótica. Adhesión y migración de leucocitos a la íntima.

Entre las moléculas de adhesión se encuentran las selectinas, selectina E y la selectina P [95], las inmunoglobulinas, y las ICAM-1 y VCAM-1 [96]. El M-CSF, también controlado por NF- κ B, es responsable de la diferenciación de los monocitos a macrófagos. Esta diferenciación conlleva la expresión de los “receptores basureros” (scavenger receptors) [97]. Estos receptores, a diferencia de los receptores LDL normales, no son regulados a la baja por la pre-

sencia de altas concentraciones de colesterol intracelular, por lo que los macrófagos captan y acumulan a través de estos receptores grandes cantidades de LDL modificadas (oxidadas, acetiladas, etc.); transformándose en células espumosas. La causa de que el receptor LDL no reconozca a las LDL_{ox} (modificadas) se debe a que el proceso de oxidación induce cambios en la parte proteica de la lipoproteína (apo B), que en cambio sí es reconocida por los receptores basureros de los macrófagos [98].

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), al contrario que las LDL, tienen una función protectora; disminuyen la oxidación de las LDL [99], así como la formación de la estría grasa [100], debido a su función en el transporte reverso del colesterol [101], sobre todo en las fases iniciales de la aterosclerosis.

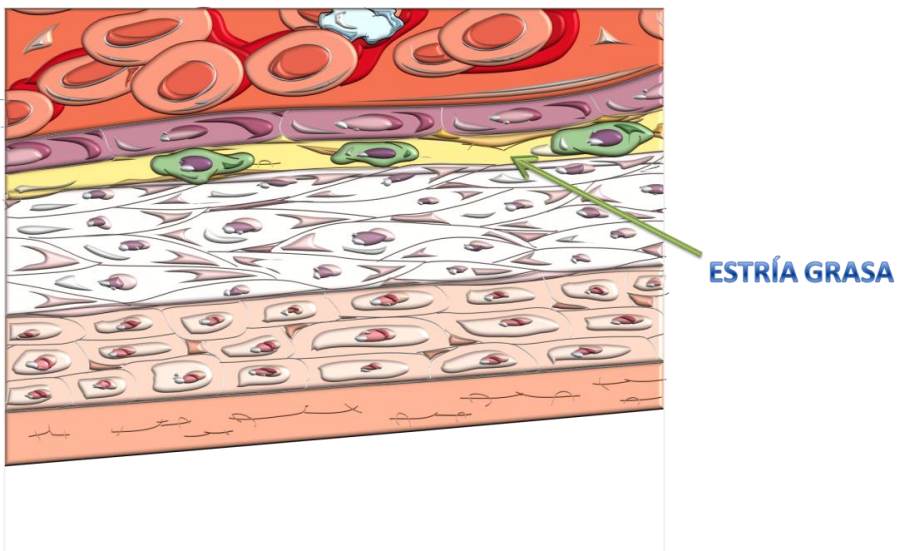


Ilustración 30. Formación de la estría grasa por acumulación de lípidos.

Progresión de la placa aterosclerótica

La estría grasa puede progresar hasta la formación de la placa [102].

Hay dos factores clave en la progresión de la lesión:

- la proliferación y migración de CML, y
- la acumulación lipídica en macrófagos y CML.

El papel de los macrófagos es central en este proceso, ya que están presentes desde el inicio de la lesión. Bajo la acción de MCP-1, M-CSF y otras citoquinas, los macrófagos se activan y se incrementa su capacidad de oxidación de lipoproteínas y de secreción de factores de crecimiento; así como diversas citoquinas inflamatorias e interferón gamma [103, 104]. Estas citoquinas continúan estimulando la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas por parte de las células endoteliales y CML, favoreciendo un proceso continuo de captación, proliferación y activación de monocitos-macrófagos, expresión de receptores basureros, captación de LDL modificadas y transformación en células espumosas; resultando en una acumulación incontrolada de lípidos en el espacio subendotelial.

Junto a los macrófagos, las CML son el componente principal de la lesión aterosclerótica. Su migración y proliferación se estimula por factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la AII y la trombina, liberados por plaquetas, macrófagos y CML [87, 105]; así como las lipoproteínas [106]. Las CML al igual que los macrófagos, también captan y acumulan LDL modificadas transformándose en células espumosas

[107, 108]. Las CML son la fuente de la matriz extracelular de la placa [109], cuyo componente principal es el colágeno tipo I, que confiere a la placa gran estabilidad estructural. La síntesis del colágeno tipo I está fundamentalmente promovida por el factor de crecimiento transformante ($\text{TGF-}\beta$), secretado por los macrófagos y CML [110].

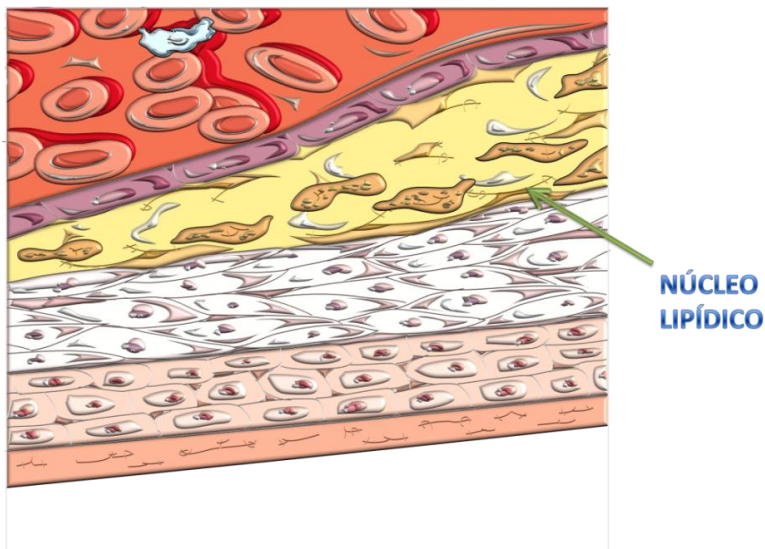


Ilustración 31. Progresión de la lesión. Formación del núcleo lipídico.

Las plaquetas tienen también un papel importante en el desarrollo de la lesión, ya que se adhieren al endotelio disfuncional, a los macrófagos o al colágeno expuesto, y liberan citoquinas y factores de crecimiento, como el PDGF y la trombina, que contribuyen a la migración y proliferación de CML y monocitos [111, 112].

Con la sucesión de todos estos procesos la estría grasa se va haciendo más compleja a lo largo del tiempo y se recubre por una o más capas de CML y tejido conectivo, dando lugar a la cápsula fibrosa.

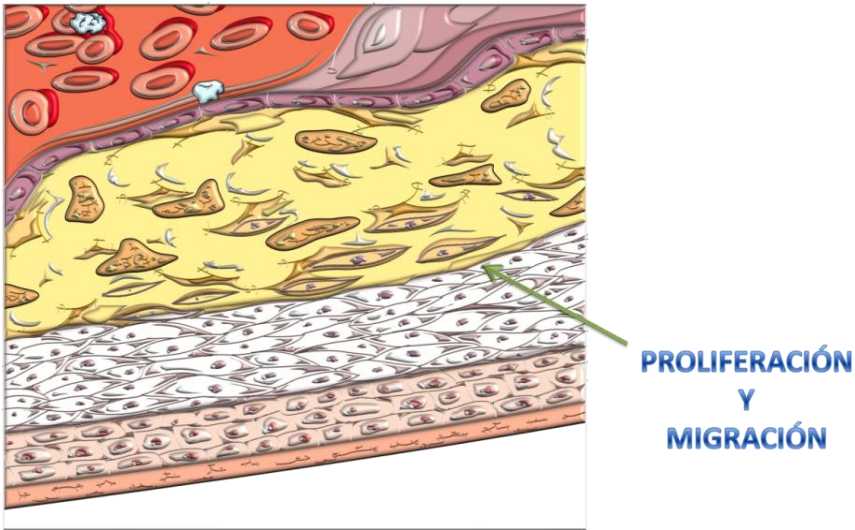


Ilustración 32. Progresión de la lesión. Proliferación y migración de CML.

Estabilidad de la placa: proceso aterotrombótico

Las placas de ateroma están formadas por un núcleo lipídico, compuesto básicamente por colesterol libre y ésteres de colesterol acumulados en el interior de macrófagos (células espumosas); separado de la luz arterial por un caparazón fibromuscular y una capa de células endoteliales. El factor predominante que va a afectar a la estabilidad de las placas ateroscleróticas es la proporción entre matriz extracelular y contenido lipídico [113, 114].

Existen dos mecanismos básicos responsables de la manifestación clínica de las placas ateroscleróticas:

- El crecimiento de la placa hasta alcanzar un tamaño umbral: reduciendo u obstruyendo completamente el paso de la sangre. Este tipo de lesiones representan la mayor parte de los procesos ateroscleróticos, pero suponen una pequeña proporción de los episodios clínicos, ya que son lesiones bastante estables. Su estabilidad se debe a un elevado componente celular y de matriz extracelular.

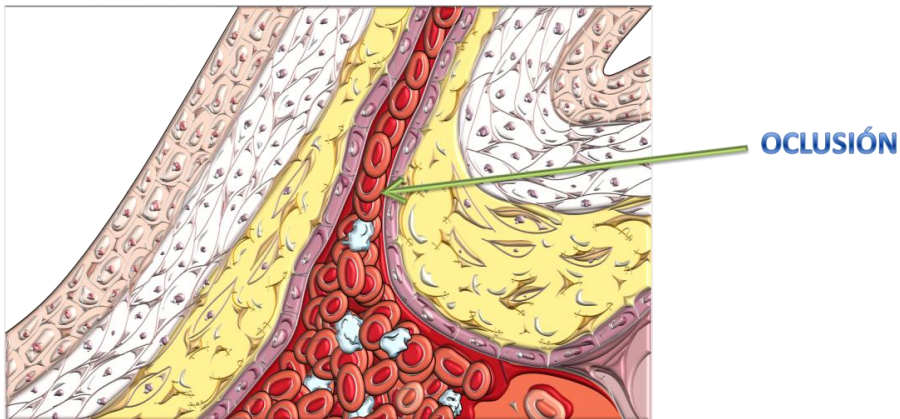


Ilustración 33. Complicación de la placa de ateroma. Obstrucción de la luz arterial.

- La rotura o fisura de la placa: induciendo la formación de un trombo. Este tipo de placas causan la mayoría de episodios clínicos [115]. Los estudios patológicos demuestran que las placas ateroscleróticas que tienden a romperse generalmente están compuestas por una masa de lípidos separados del lumen vascular por una cubierta fibrosa delgada [116]. Las placas que se rompen tienden a ser relativamente

blandas y a tener una concentración elevada de colesterol y de sus ésteres. El adelgazamiento de la cubierta fibrosa que cubre el núcleo lipídico precede a la rotura de la placa. Mediante estudios angiográficos, angioscópicos y patológicos se ha establecido una clara asociación entre la fisura de la placa o su ulceración y el desarrollo de la angina inestable, el infarto de miocardio y la muerte súbita de carácter isquémico [117, 118]. Además, la trombosis mural formada sobre la placa rota, es también importante en la progresión de las placas ateroscleróticas, incluso en ausencia de síntomas clínicos [119]. Estos procesos de ruptura, trombosis o hemorragia intraplaca que no llevan asociados cuadros clínicos, sí contribuyen al crecimiento de la placa de ateroma [120, 121].

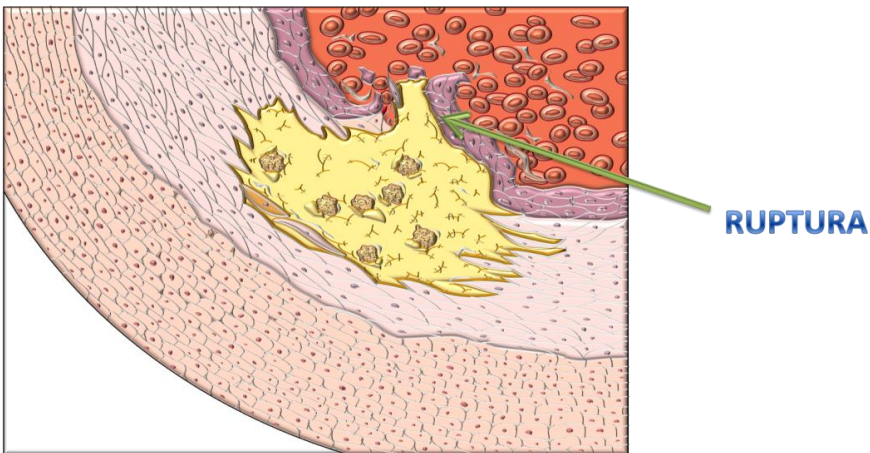


Ilustración 34. Complicación de la placa de ateroma. Ruptura y formación de trombo.

Una vez formada la lesión aterosclerótica, todos aquellos fenómenos que reduzcan su contenido en colágeno o disminuyan la presencia de CML que lo producen, debilitarán la cápsula fibrosa y harán que la placa sea más vulnerable y propensa a la rotura. Las células espumosas son determinantes, ya que son capaces de digerir la matriz extracelular por fagocitosis directa o por la secreción de enzimas proteolíticas, como el activador del plasminógeno tisular (t-PA), TNF- α , y una variedad de MMP (colagenasas, gelatinasas y estromelinas) [88, 122]. Además, la producción de tóxicos, como los radicales libres oxidantes y productos de la oxidación lipídica, también contribuyen al daño vascular y a la inestabilidad de la placa.

La ruptura de la placa supone la desendotelización de la pared vascular y la exposición de las capas interiores ricas en colágeno, factor tisular (TF), lípidos y otros factores que activan la agregación plaquetaria y la formación de un trombo que puede ser oclusivo e impedir de forma súbita la circulación de la sangre o en cualquier caso, contribuir al crecimiento de la lesión aterosclerótica que produce una lesión silenciosa.

El proceso de ruptura de la placa de ateroma puede estar influido por una serie de factores, tanto locales como sistémicos; que al mismo tiempo pueden estar determinando la patogénesis de la aterosclerosis [123].

Factores locales

Desde una perspectiva local, la ruptura de la placa de ateroma se atribuye a cambios que se producen en la misma.

La mayoría los hallazgos provienen de estudios de ARN_m y expresión proteica en placas ateroscleróticas humanas y de estudios en modelos animales de aterosclerosis.

Mediadores inflamatorios

El influjo de células inflamatorias (macrófagos y células T) hacia las placas ateroscleróticas aumenta con la progresión de la lesión y en un mayor grado hacia los sitios de ruptura [88, 124, 125].

En las lesiones ateroscleróticas humanas se encuentran expresados numerosos mediadores inflamatorios, especialmente en las zonas de ruptura [126]. Entre estos encontramos moléculas de adhesión leucocitaria (E y P-selectinas, ICAM-1, VCAM), quimioquinas (MCP-1, receptor C-C de quimioquinas -CCR-2-, IL-8, receptor de quimioquinas CXC -CXCR3-, CX3CR1), citoquinas (G-MCSF, IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α , interferón -IF- γ -, CD40, ligando del clúster de diferenciación 40 -CD40L-) [88, 126] y PCR [127].

Estudios en modelos animales bloqueando estos mediadores, encuentran un descenso en la progresión de la placa [128-130]; así como cambios en su composición hacia fenotipos ricos en colágeno, con descenso de lípidos y células inflamatorias [131-140].

Mediadores de fibrosis

El recambio de la matriz extracelular es otro factor regulador importante en la ruptura de la lesiones ateroscleróticas.

El TGF- β , inductor de la síntesis de colágeno, se expresa en todos los tipos de lesiones, pero la expresión de sus receptores disminuye con la progresión de la lesión [141]. Además, niveles bajos de TGF- β en plasma se asocian con peor pronóstico en la enfermedad arterial coronaria [142].

En las lesiones ateroscleróticas también se expresan MMP (1,2,3,7,8,9,14) [143, 144]; catepsinas S y K [145]; así como sus inhibidores específicos TIMP (tisular) [143] y cistatina C [146]). Tanto las MMP-1, MMP-3 y MMP-9, como las catepsinas K y S, se encuentran aumentadas en el borde de la región vulnerable [143, 145]. Esta actividad proteolítica está dirigida por la actividad inflamatoria en la placa, y es responsable de la degradación y adelgazamiento del área fibrosa; favoreciendo la ruptura [89].

Estudios en modelos animales revelan que la inhibición de TGF- β induce un fenotipo de placa con una inflamación pronunciada, cápsula fibrosa fina y hemorragias intraplaca [147, 148]. Sin embargo, los efectos de la modulación de las MMP en la aterosclerosis no son tan claros, de forma que la inhibición de MMP-1 reduce la aterosclerosis [149], mientras que la inhibición de MMP-3 no afecta a la progresión de la placa [150]; al igual que ocurre con TIMP-1 [150, 151]. La inhibición de las catepsinas influye también en la aterosclerosis [152], de forma que la inhibición de la Catepsina S conlleva lesiones más pequeñas con menor inflamación [153].

Mediadores de coagulación

Otro grupo de moduladores locales de ruptura de la placa de ateroma es el de aquellos relacionados con la coagulación sanguínea [154].

En lesiones ateroscleróticas humanas avanzadas, principalmente en áreas de ruptura, se encuentra aumentada la expresión del TF, así como su inhibidor (TFPI) [155], la protrombina, el tPA, el activador urokinasa del plasminógeno (uPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) [156]; mientras que anticoagulantes como la antitrombina III y la α -2 macroglobulina están disminuidos [157].

Estudios en modelos animales demuestran que una inyección de plaquetas activadas exacerban la progresión de la placa [158]. Además, la inhibición del TF [159], así como del PAI-1 [160], resulta en un aumento de la aterosclerosis.

Perfil de expresión génica

Los estudios de expresión génica en placas de ateroma humanas, así como de intervención en modelos animales, revelan el papel que juegan las moléculas inflamatorias, el recambio de la matriz extracelular y la coagulación; así como de otras moléculas aún desconocidas, en la progresión y ruptura de las placas.

De esta forma, la comparación de los perfiles de expresión génica entre placas de ateroma humanas estables y placas rotas sugiere un papel importante para la perilipina y la catepsina K en la ruptura; así como de otros genes desconocidos como la vasculina [161, 162].

El principal problema de estos estudios es que se desconoce dónde y cuándo son críticos estos procesos, induciendo la ruptura de la placa de ateroma.

Factores sistémicos

Desde una perspectiva sistémica, la ruptura de la placa de ateroma no ocurre como un fenómeno aislado, sino más bien como una enfermedad sistémica.

Como factores sistémicos que se correlacionan con la ruptura de la placa aparecen la reología de la sangre, un estado de coagulabilidad aumentado, una inflamación sistémica aumentada e infecciones recurrentes.

Estos cambios sistémicos desfavorables a menudo actúan de forma sinérgica con factores de riesgo de aterosclerosis y de ruptura de la placa, como la hiperlipidemia, el tabaquismo y la diabetes [163-165].

Debido a que el estado sistémico de un paciente parece influir en la incidencia de la ruptura de la placa de ateroma, han sido estudiados numerosos marcadores plasmáticos con el fin de clasificar a los individuos con riesgo elevado de ruptura. Así, se ha visto que niveles elevados de marcadores inflamatorios (PCR [166], selectina P [167], ICAM-1 soluble, VCAM-1 soluble [168], IL-6 [169], TNF- α [170], IL-18 [171], CD40L [172]) son capaces de predecir un riesgo cardiovascular futuro en diversas condiciones clínicas. Otro grupo de marcadores están asociados con la cascada de la coagulación y la proteólisis, de forma que niveles elevados de fibrinógeno [173], factor von

Willebrand (vWF) [174], PAI-1 [175], TF [176, 177], tPA [177] y MMP-9 [178], indican también un riesgo elevado de episodios cardiovasculares.

En concordancia con esta perspectiva sistémica están las terapias farmacológicas que a menudo disminuyen los marcadores séricos que se correlacionan con la ruptura de la placa; como la reducción de niveles plasmáticos de PCR y niveles séricos de CD40L soluble por estatinas [179, 180]. El tratamiento para la reducción de niveles plasmáticos de LDL mediante estatinas [181], el tratamiento anticoagulante con aspirina [182], heparinas [183], o antagonistas plaquetarios como clopidogrel [184] e inhibidores de glicoproteínas IIb/IIIb, inhibidores de angiotensina II tipo 1, β -bloqueantes, inhibidores de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y tiazolidinedionas; previene de nuevos episodios cardiovasculares [185].

De esta forma, las terapias con más éxito en la prevención de episodios cardiovasculares se ve que están basadas en una mejora de los parámetros sistémicos [186].

Visión integradora

El mecanismo de ruptura de la placa de ateroma es todavía desconocido, aunque, tanto marcadores sistémicos como el tratamiento sistémico, predicen y previenen nuevos episodios cardiovasculares. También la modulación de factores locales asociados a la placa, son capaces de cambiar su progresión y su composición. Así, la terapia local con rampamicina en stents es capaz de prevenir la reestenosis después de ATP coronaria al menos durante 12 meses [187]. El tratamiento con estatinas también se ha visto que es

capaz de reducir la inflamación local de la placa de ateroma, aumentar el grosor de la cápsula fibrosa e inducir la regresión de la placa [188].

En una visión integradora los factores que modulan la ruptura de la placa localmente suelen ser los mismos factores que también se encuentran circulantes sistémicamente. Esto sugiere un paralelismo en la patogénesis local y sistémica de la ruptura de la placa. Además, la modulación de factores sistémicos puede tener un efecto sobre la biología local de la placa, y viceversa. De este modo, numerosos moduladores de inflamación, fibrosis y coagulación, como CD40L, MMP9 y TF, no sólo se emplean como marcadores sistémicos de aterosclerosis sino que también participan en el desarrollo de la ruptura de estas lesiones.

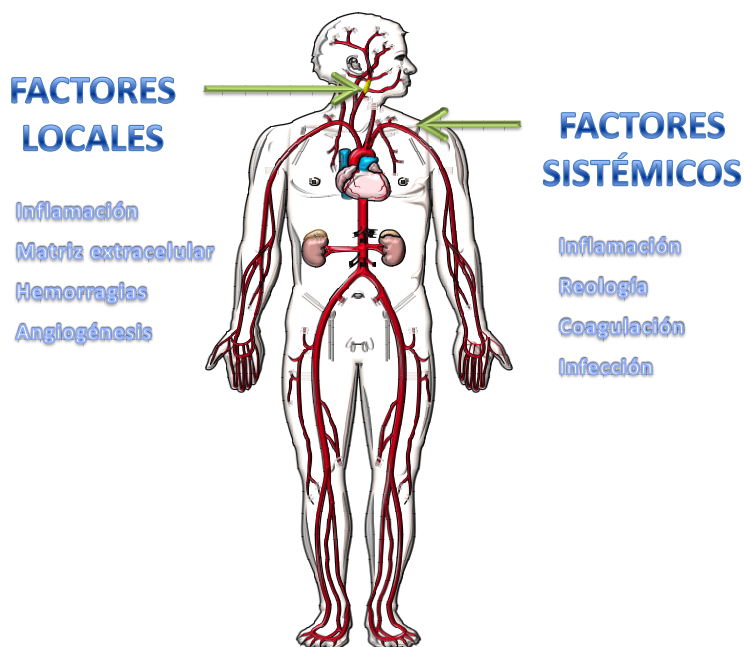


Ilustración 35. Visión integradora de la ruptura de la placa de ateroma.

Estudio morfológico de la placa de ateroma

Estudio histopatológico

En el siglo XVIII Morgagni en su libro “*Desedibus et causis morborum per anatomen indagatus*”, describe una forma característica de disecar y abrir los vasos sanguíneos, que con algunas modificaciones continúa siendo el procedimiento más empleado en la actualidad para los estudios morfológicos de la íntima arterial afectada por la aterosclerosis. En 1932 Casper [189] realiza de forma sistemática la apertura longitudinal de la arteria y su extensión sobre un cartón para ser fijada en formalina dejando descubierta la íntima y permitiendo su estudio anatomopatológico. Desde 1956, la OMS ha organizado y dirigido varios grupos de expertos con el objetivo de obtener un método validado para la caracterización de la placa aterosclerótica: en 1958, Holman [190] define 4 variedades de lesiones ateroscleróticas: estría lipídica, placa fibrosa, placa complicada y placa calcificada. Dos años más tarde el mismo autor [191] en el “Informe del Comité de Lesiones de la Sociedad Americana para el Estudio de Aterosclerosis”, señala que la calcificación de la placa era uno de los procesos que contribuía a su complicación; por lo que se decide reunir ambas características con la denominación de placa complicada. Desde entonces muchos y muy variados han sido los métodos utilizados para los estudios morfológicos [192].

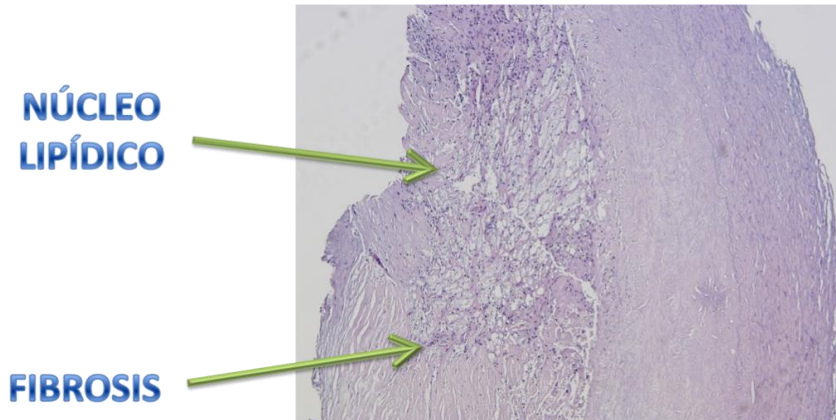


Ilustración 36. Histología de la lesión aterosclerótica.

En general, se definen 3 tipos de lesiones según el aspecto macro y microscópico:

- Estría lipídica: estría o banda de color amarillo intenso que aparece en la endoarteria.
- Placa fibrosa: lesión aterosclerótica grado II: lesión blanquecina y dura que protruye a la luz arterial.
- Placa grave: lesión aterosclerótica grado III: placa que ha sufrido ruptura endotelial (ulceración), calcificación, hemorragia, trombosis, necrosis o abscesificación.

Se definen como placas elevadas todas las lesiones con protrusión a la luz vascular, como son las placas fibrosas y las placas graves.

En 1995 la “American Heart Association” (AHA) [193] amplía la clasificación distinguiendo 6 tipos :

- Lesión aterosclerótica tipo I: presencia de células espumosas en el espacio subendotelial que provoca engrosamiento de la íntima.
- Lesión aterosclerótica tipo II: presencia de acúmulo de células espumosas que constituyen la estría grasa.

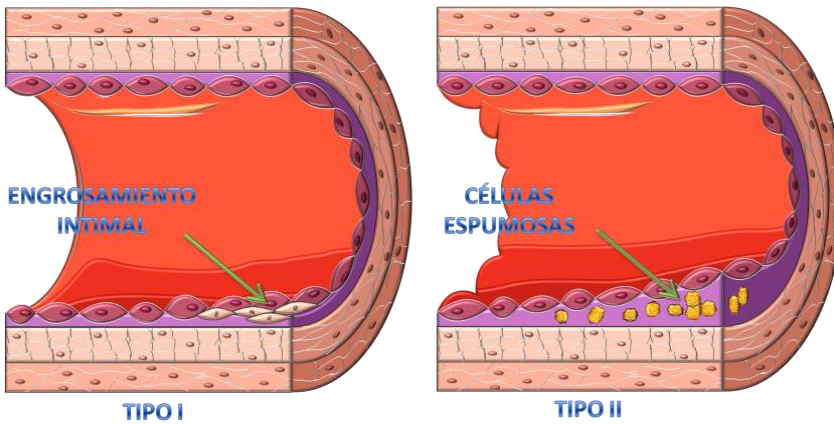


Ilustración 37. Representación de la histología de las lesiones tipo I y II.

- Lesión aterosclerótica tipo III: acúmulo aislado de lípidos extracelulares que producen soluciones de continuidad en la adherencia de las células musculares lisas.
- Lesión aterosclerótica tipo IV: acúmulo importante de lípidos extracelulares que se reúnen constituyendo el núcleo lipídico.

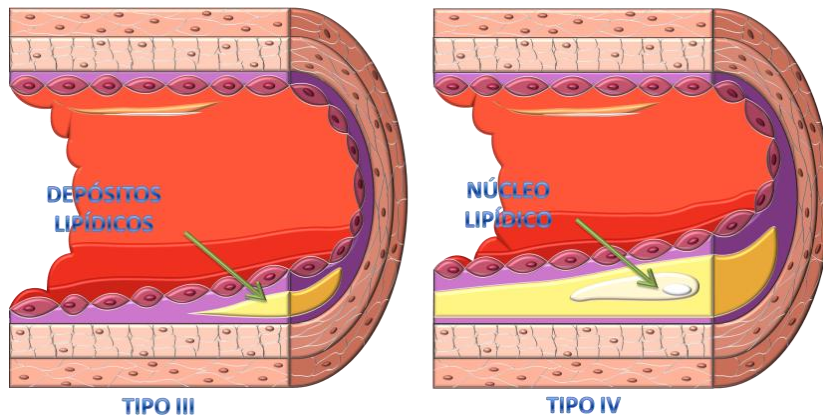


Ilustración 38. Representación de la histología de las lesiones tipo III y IV.

- Lesión aterosclerótica tipo V: aparición de tejido conjuntivo fibroso junto con los lípidos extracelulares. Pueden ir acompañadas de calcificación o no. Son las placas definidas previamente como fibrosas.
- Lesión aterosclerótica tipo VI: presencia de ulceración, hemorragia intraplaca o trombo. Son las placas complicadas o graves de otras clasificaciones.

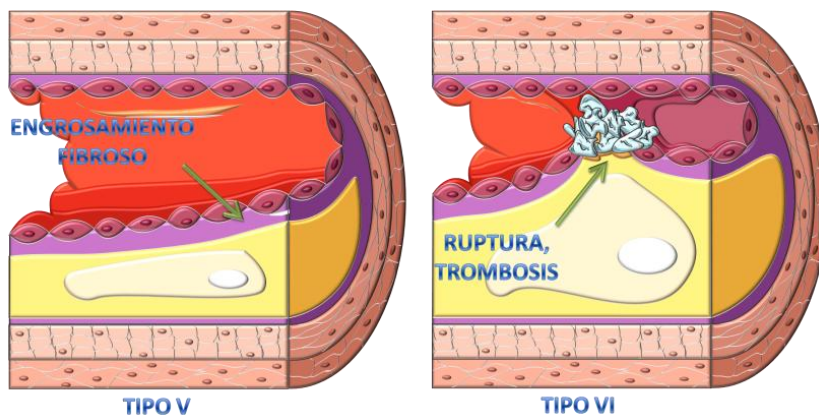


Ilustración 39. Representación de la histología de las lesiones tipo V y VI.

En el año 2000 [120] es revisada la clasificación morfológica de las lesiones ateroscleróticas establecida por la AHA [83, 193]. Estas modificaciones afectan principalmente a las placas de tipo IV, V y VI; lesiones de tipo intermedio y avanzado que potencialmente pueden desarrollar trombosis [193]. Según la clasificación de la AHA, aquellas lesiones avanzadas que causan complicaciones son por ruptura de la placa que desencadena el fenómeno de trombosis. Sin embargo, diversos estudios han encontrado que este parámetro no es suficiente para dar cuenta de los episodios clínicos derivados de las placas complicadas [124]. Estos y otros resultados [194-200] presentan el fenómeno de trombosis como algo que puede aparecer sin ruptura de la placa de ateroma.

LESIÓN	DESCRIPCIÓN
TIPO I	Lesión inicial
TIPO II	
IIa	Lesión propensa a progresar
IIb	Lesión propensa a resistir
TIPO III	Lesión intermedia: preateroma
TIPO IV	Ateroma
TIPO V	
Va	Fibroateroma
Vb	Lesión calcificada
Vc	Lesión fibrótica
TIPO VI	Lesión con defecto en la superficie y /o hematoma/hemorragia y/o depósito trombótico

Tabla 4. Clasificación de las lesiones ateroscleróticas según la AHA.

De esta forma, basándose exclusivamente en criterios morfológicos, sin atender a posibles mecanismos, y eliminando el carácter de evolución temporal que sugiere la clasificación de la AHA, se propone una clasificación en 7 categorías. En esta nueva clasificación las complicaciones de las lesiones avanzadas pueden ser resultado de diferentes mecanismos:

- por trombosis: por ruptura de la placa de ateroma (área de disrupción del área fibrosa donde el trombo superior esta en continuidad con el núcleo necrótico subyacente)
- por erosión superficial: se identifica cuando en secciones seriadas del segmento arterial trombosado falla para revelar ruptura de la capsula fibrosa
- por aparición de nódulos calcificados: lesión con ruptura del área fibrosa, y trombos asociados con nódulos calcificados eruptivos y densos
- por hemorragia intraplaca: por deposición de productos sanguíneos dentro de la placa. No está necesariamente asociada con la ruptura de la placa.

Estudio clínico-vascular

Las técnicas de imagen permiten la visualización de características estructurales y morfológicas de la placa aterosclerótica. Estas técnicas pueden valorar tanto características morfológicas de las placas como propiedades funcionales.

Ultrasonografía

En la actualidad el método más utilizado en la práctica clínica diaria es el análisis de la imagen ecográfica en modo B de alta resolución.

La clasificación definida por Gray-Weale [201] es la que con frecuencia más se utiliza. En esta, las placas se dividen en 4 grupos en base a la ecogenicidad:

- Tipo 1: predominantemente ecolucente.
- Tipo 2: principalmente ecolucente, pero con áreas ecogénicas.
- Tipo 3: principalmente ecogénica, pero con áreas ecolucentes.
- Tipo 4: uniformemente ecogénica.

Al comparar esta clasificación con la presencia o ausencia de episodios clínicos neurológicos se observa una relación entre pacientes sintomáticos y placas tipo 1 y 2; mientras que los pacientes asintomáticos tienen mayor prevalencia de placas tipo 3 y 4 [202, 203].

Además, esta técnica permite detectar el tamaño del núcleo necrótico en base a la ecogenicidad de la placa: placas homogéneas hiperecoicas son más fibrosas, mientras que las hipoecoicas están asociadas con núcleos lipídicos amplios [204].

Aparte del carácter eco o anecogénico [205-207], el eco-Doppler aporta información sobre la superficie de la placa [208], de forma que las que presentan una superficie irregular se asocian más con infartos cerebrales de origen embolígeno (placas ulceradas [209]); mientras que las que presentan una

superficie lisa están más relacionadas con infartos de características hemodinámicas [210].

IVUS

Los ultrasonidos intravasculares (IVUS) es una técnica de imagen basada en catéter que proporciona imágenes de ultrasonidos de alta resolución del lumen y la pared de la arteria.

Es la única modalidad de imagen capaz de proporcionar imágenes en las que las variaciones en la geometría arterial y en la placa aterosclerótica a lo largo de la arteria se pueden observar simultáneamente in vivo. Además de revelar información sobre al área del lumen, el área de la placa y el área del vaso, esta modalidad de imagen puede identificar componentes morfológicos de la placa a través de diferencias en la ecogenicidad [211].

DTC

El doppler transcraneal (DTC) es una técnica que indirectamente puede dar información de la estabilidad de la placa; basándose en su capacidad para detectar microembolias (MES) que podrían traducir la presencia de una placa carotídea complicada o inestable. Las microembolias detectadas mediante DTC son señales transitorias (duración inferior a 300 ms), con una intensidad de la señal al menos de 3 dB superior a la del flujo sanguíneo, unidireccionales en el espectro Doppler y que presentan un sonido característico tipo “snap” [212]. El significado clínico de las MES no está claramente definido: se han detectado en pacientes con estenosis carotídea, estenosis in-

tracraneales, prótesis valvulares cardíacas, fibrilación auricular, ictus agudo, durante la tromboendarterectomía carotídea y en pacientes sometidos a cirugía extracorpórea [213-216].

En la patología carotídea diversos autores han hallado relación entre la presencia de MES y estenosis carotídea con resultados variables según la serie: 23,5 % para estenosis > 70 % y 3,4 % para estenosis 50-70 % [217], 42,2% y 17,9 % para los mismos parámetros [218]. Asimismo, se ha propuesto una mayor asociación entre presencia de MES y estenosis carotídea sintomática. Son más escasos los estudios que correlacionan la presencia de MES y la morfología de la placa carotídea. En un estudio se encuentra una relación altamente significativa entre MES y ulceración [219].

Arteriografía

La arteriografía se considera el procedimiento estándar en el diagnóstico delgado de estenosis; si bien tiene un valor relativo bajo en la caracterización de la placa. La serie estudiada, más amplia a este respecto, es la del Ensayo Norteamericano de Endarterectomía Carotídea Sintomática (NAS-CET) [220], donde se compara la ausencia o presencia de úlcera en la arteriografía y el estudio macroscópico de 500 placas obteniendo una sensibilidad y especificidad del 45,9 % y del 74,1 %, respectivamente, con un valor predictivo positivo para la identificación de úlcera del 71,8 % [209]. Resultados similares han sido obtenidos aportando una fiabilidad para el diagnóstico de ulceración del 60 % [221].

Angio-TC

La Angio-TC [222] es otra técnica de imagen no invasiva que tiene múltiples aplicaciones: detección no invasiva de estenosis arteriales, y también es capaz de detectar calcificaciones que correlacionan con los hallazgos histopatológicos; aunque es limitada para la identificación de otras características de la placa como el tamaño del núcleo lipídico y el grosor del área fibrosa [211].

Angio-RM

La Angio-RM [223] es una técnica emergente capaz de identificar una serie de aspectos importantes de la lesión aterosclerótica como el tamaño de la placa, el tamaño del núcleo lipídico, calcificaciones, tejido fibroso y grosor de la cápsula fibrosa [211].

IMAGEN MOLECULAR

Las técnicas de imagen molecular convencionales están basadas en la heterogeneidad anatómica y fisiológica para proporcionar diferencias de imagen. La imagen molecular puede ayudar a identificar dianas moleculares específicas, rutas y procesos moleculares con el uso de moléculas, que están especialmente asociadas con la inestabilización de la placa aterosclerótica, marcadas radioactivamente. La identificación de marcadores moleculares específicos radiomarcados, con diferentes técnicas de imagen, puede permitir la detección de la enfermedad en estadios iniciales y la discriminación entre elementos activos e inactivos y fases de la enfermedad [211].

Otras técnicas

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de imagen experimental, capaz de una detección precisa de la composición de la placa. Es capaz de identificar la infiltración de macrófagos con una buena correlación con la histología; aunque su penetración es limitada [211].

La elastografía basada en IVUS es una técnica introducida para valorar las propiedades mecánicas locales (elasticidad) de la pared arterial; basándose en la diferente dureza de los elementos de los tejidos a la compresión por presión mecánica [211].

Tratamiento y prevención

Tratamiento médico

La identificación de los factores de riesgo es importante en la prevención del ictus; de forma que el control de estos puede reducir el riesgo de ictus [224, 225].

Todos los pacientes con enfermedad carotídea deben recibir un tratamiento médico, que incluye tratamiento antiagregante y otra medicación para tratar los factores de riesgo modificables [226]:

- Para pacientes asintomáticos con 1 o más factores de riesgo de aterosclerosis: la terapia antiagregante está indicada para la prevención primaria de episodios clínicos.

- Para pacientes sintomáticos: las recomendaciones para el tratamiento antiagregante están basadas en estudios de prevención de ictus que incluyen pacientes con ictus de diferentes etiologías [227-239].

El tratamiento farmacológico puede incluir:

- Aspirina: su uso está aprobado para prevención secundaria en individuos con antecedentes previos de AIT o ictus. La reducción del riesgo relativo es del 16% de ictus fatal y del 28% para ictus no fatal [240].
- Dipyridamol: no está recomendado en prevención primaria de enfermedad cardiovascular o ictus. En prevención secundaria es importante el dipyridamol de liberación prolongada, sólo o en combinación con aspirina [231, 232].
- Tienopiridinas: la ticlopidina y el clopidogrel no han sido probados en grandes estudios de prevención primaria. El clopidogrel ha reemplazado a la ticlopidina dada su superioridad en cuanto a seguridad y su dosis de una sola toma diaria. La combinación de clopidogrel y aspirina parece tener eficacia similar en la prevención secundaria del ictus; pero la combinación puede aumentar el riesgo de sangrado, y no es superior a ninguno de los fármacos por sí solo [235-237].
- Warfarina: a no ser que se contraindique, está recomendada en prevención primaria y secundaria de ictus en pacientes con fibrila-

ción atrial. Sin embargo, no es más efectiva que la aspirina en la prevención de ictus aterotrombóticos; por lo que el tratamiento está indicado hacia aspirina [240].

- Tratamiento antilipemiente: la pravastatina, simvastatina y atorvastatina están aprobadas por la agencia americana del medicamento (FDA) para la prevención de ictus en pacientes con enfermedad coronaria [241-243]; aunque los beneficios pueden ser mediados por efectos antiinflamatorios, estabilización de la placa y neuroprotectores, más que por la reducción de colesterol. Las estatinas también son efectivas como prevención secundaria [244, 245].
- Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina y bloqueantes de los receptores de la angiotensina: en pacientes con hipertensión, la reducción del riesgo de ictus está directamente relacionada con la reducción de la presión sanguínea, independientemente del tipo de antihipertensivos prescritos. Además de la reducción de la presión sanguínea, otros efectos beneficiosos potenciales de los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina y de bloqueante del receptor de la angiotensina incluyen la inhibición de la vasoconstricción mediada por angiotensina II y la proliferación de células musculares vasculares, mejoría de la función endotelial y una fibrinólisis aumentada [185, 246-248].

Indicaciones

Se recomienda la modificación de los factores de riesgo hacia unos valores adecuados con terapia médica, para limitar la progresión de la aterosclerosis y disminuir episodios clínicos; independientemente de la revascularización.

El tratamiento antiagregante está recomendado para pacientes sintomáticos.

El tratamiento médico por sí sólo está recomendado para pacientes en los que el riesgo de revascularización es mayor que sus beneficios; incluyendo pacientes con bajo riesgo de ictus con tratamiento médico (estenosis sintomáticas menores del 50%, estenosis asintomáticas menores del 60%) y aquellos con alto riesgo de ictus o muerte relacionado con el procedimiento, bien por factores clínicos o técnicos [226].

Tratamiento quirúrgico

Revisión histórica

En 1803 David Fleming realiza la primera ligadura de arteria carótida en un marinero. En 1951, Carrea, Molins y Murphy efectúan la primera reconstrucción de la arteria carótida realizando la resección del segmento estenosado de la misma y una trasposición de la carótida externa a la arteria carótida interna distal mediante anastomosis de extremo a extremo. Dos años más tarde, Strully lleva a cabo una endarterectomía carotídea y, aunque no puede obtener un flujo retrógrado desde la ACI, liga el vaso para evitar una posible embolia. En 1953 Michael DeBakey lleva a cabo con éxito la primera

tromboendarterectomía carotídea tal y como se conoce actualmente. En 1954, Eascott y Rob realizan una reconstrucción carotídea en una mujer de 66 años que había presentado un AIT múltiple utilizando la hipotermia como mecanismo de protección cerebral, la paciente vivió hasta los 86 años. En 1956, Cooley introdujo el uso del shunt y en 1960 Crawford describió el uso de la presión arterial como indicador de la perfusión cerebral [249]. En la década de los 80, la endarterectomía carotídea (CEA) fue el procedimiento quirúrgico vascular realizado con más frecuencia. Sin embargo, el fallo en el bypass carótida externa-interna para prevenir el ictus [250], y la ausencia de datos clínicos la frenaron por dudas en cuanto a su seguridad y eficacia [251]. Subsecuentemente, a finales de los 80 y comienzos de los 90, 6 ensayos aleatorizados establecieron la eficacia de CEA junto con la aspirina, comparados con aspirina sola, en la prevención de ictus en pacientes con estenosis aterosclerótica en la bifurcación carotídea [252-258].

Actualmente, la CEA es el estándar en la terapia revascularizadora.

Procedimiento

Las intervenciones de la bifurcación carotídea pueden realizarse con anestesia general o con bloqueo loco-regional [259]. Las ventajas de la primera son básicamente tres: el anestesiólogo tiene mayor control sobre la vía aérea, se pueden utilizar fármacos que aumentan el FSC y disminuyen el metabolismo del córtex y resulta más cómodo tanto para el paciente como para el cirujano. La mayor ventaja del bloqueo cervical es la monitorización de posibles déficits neurológicos durante las maniobras quirúrgicas.

Un aspecto importante en la CEA es la posición del paciente: debe estar con el cuello hiperextendido y con la cabeza ladeada hacia el lado opuesto de la ACI a intervenir. Para la exposición de la bifurcación carotídea se realiza una incisión paralela al borde anterior del músculo esternocleidomastoideo siguiendo una línea imaginaria que une la apófisis mastoides y la articulación esternoclavicular. Continuando la disección por planos, se debe seccionar el platismo del cuello y localizar la fascia existente entre el esternocleidomastoideo y la tráquea, siendo necesaria habitualmente la ligadura del tronco venoso facial que atraviesa el campo quirúrgico en dirección medio-lateral. Una vez localizada la bifurcación carotídea se realiza disección proximal y distal para la individualización de la carótida primitiva, arteria cerebral externa (ACE) y primeras colaterales y ACI. Es importante evitar la lesión de los nervios vago, situado posterolateralmente a la arteria carótida, e hipogloso que atraviesa distalmente la carótida interna y externa. En algunos casos para mejor visualización y control de la carótida distal se puede seccionar el asa descendente del hipogloso y el músculo digástrico en su tendón intermedio pudiendo alcanzar de esta forma la parte de carótida interna que no está afectada por el ateroma [260]. Una vez aislados los segmentos proximal y distal se procede a la heparinización sistémica. Es esencial una hemostasia cuidadosa al finalizar la intervención ya que el espacio anatómico del cuello está restringido por tractos fibrosos y una hemorragia a este nivel puede tener un desenlace fatal [261-263].

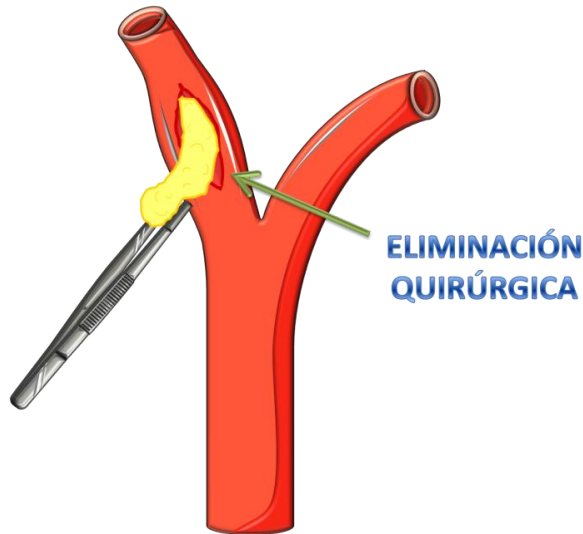


Ilustración 40. Representación de revascularización por CEA.

La endarterectomía puede realizarse con diversas técnicas [264]:

- Endarterectomía clásica: se realiza una arteriotoμία longitudinal, extendiéndose proximal y distalmente unos pocos milímetros del final de la placa, se localiza un plano de clivaje entre la lesión intimal y la túnica media y se procede a la endarterectomía, que siguiendo el plano adecuado conduce a una porción distal que termina estrechándose hasta llegar a pared sana. La reconstrucción de la arteriotoμία puede hacerse con sutura directa o más frecuentemente interponiendo un parche [265, 266]; bien de material autólogo (vena safena, habitualmente), bien de material sintético (politetrafluoroetileno, dacron) [267, 268].

- Endarterectomía por eversión: se efectúa un corte oblicuo en el origen de la ACI y se procede a la endarterectomía en su porción proximal, posteriormente ésta se everta y se procede a completar la CEA de la ACI, ACE y arteria carótida común. La reconstrucción se lleva a cabo mediante implante de la ACI en ACP. Bypass carotídeo: se realizan dos incisiones en la pared anterolateral de ACI y ACP y se procede a la realización de las dos anastomosis. El material utilizado suele ser vena safena o politetrafluoroetileno.

Indicaciones

Las guías actuales de la AHA recomiendan la CEA en pacientes sintomáticos con estenosis entre el 50% y el 99%; siempre que el riesgo perioperatorio de ictus o muerte sea menor del 6% [226]. Para pacientes asintomáticos, estas guías recomiendan CEA para pacientes con estenosis entre el 60% y el 99%, siempre que el riesgo perioperatorio de ictus o muerte sea menor del 3% [226].

Tratamiento endovascular

Revisión histórica

La ATP se describe por primera vez en 1964 por Dotter y Judkins [269]; aunque no es hasta 1974 cuando se utiliza por primera vez el catéter con balón de dilatación de doble luz [270]. La técnica se empieza a utilizar y difundir con rapidez en lesiones estenosantes de ilíacas, femorales, renales, tronco celíaco, mesentéricas y coronarias con una tasa de éxito de 90% y

una morbimortalidad del 5% [271] . Sin embargo, en la arteria carótida no comienza a usarse hasta años más tarde. En 1977, Mathias propone la idea de la angioplastia en la carótida. En 1980, Mullan [272] describe la primera ATP carotídea realizada con éxito en un paciente con estenosis concéntrica. Desde este momento empiezan a publicarse casos aislados en pacientes con displasia fibromuscular [273] y reestenosis tras CEA [274]. También en ésta década se utiliza la ATP en arterias vertebrales, subclavias y tronco innominado debido al escaso riesgo de embolismo cerebral [275]. Esto conlleva a establecer su indicación como técnica de elección frente a la cirugía en estenosis/oclusión de tronco innominado, arterias subclavias y vertebrales y estenosis carotídeas secundarias a displasia fibrosa, reestenosis postquirúrgicas o postradioterapia. Posteriormente se publican de forma aislada casos de ATP en pacientes con estenosis ateromatosa carotídea con resultados diversos, aunque con escaso número de complicaciones. Sucesivamente aparecen series de pacientes con seguimiento a corto plazo que permiten obtener conclusiones sobre la posible utilización de la ATP en aquellos pacientes con criterios de exclusión para la CEA; y la posible alternativa a éste técnica en todos los pacientes con estenosis carotídea ateromatosa.

En el año 2001, se publican los resultados del Estudio de la Angioplastia Transiluminal de las Arterias Carótida y Vertebral (CAVATAS), ensayo clínico en el que se compara eficacia y seguridad de ATP frente a CEA [276]. El objetivo era investigar el riesgo y beneficio de la ATP frente a la CEA, con la hipótesis de que el tratamiento endovascular podría tener las mismas complicaciones mayores y menor morbilidad que la cirugía. Los resultados obtenidos

fueron similares en ambos grupos en cuanto a mortalidad (3% en ATP versus 2% CEA), muerte e ictus mayor (6% en ambos), muerte o cualquier ictus (10%), concluyéndose la necesidad de realizar más ensayos clínicos para evaluar reestenosis a largo tiempo y determinar si la colocación de stents disminuye el riesgo de embolismos distales y reestenosis. Por ello se inician nuevos ensayos clínicos actualmente en marcha.

Recientemente se ha publicado una revisión sistemática [277] de todas las series de ATP publicadas con y sin stent y/o balón de protección distal; y aunque la media de la morbi-mortalidad a 30 días es del 5,5%, similar a los ensayos de CEA; la heterogeneidad de los pacientes incluidos y de las técnicas usadas hace que sea necesario realizar ensayos clínicos que corroboren los resultados.

La realización de diferentes ensayos conlleva además un perfeccionamiento de la técnica, por ejemplo debido a una alerta publicada en la revista *Stroke* sobre el ensayo clínico en marcha *Endarterectomía Versus Angioplastia* en pacientes Sintomáticos con Estenosis Carotídea Severa (EVA 3S) [278]; por la alta incidencia de ictus en los primeros 30 días (3,9%) en el grupo de angioplastia sin protección cerebral frente a ATP con protección (4/15 versus 5/58); haciendo que se cuestione la obligatoriedad o necesidad del uso de protección en el resto de los estudios.

Procedimiento

Las primeras ATP se realizan con catéter con balón de dilatación de doble luz. Posteriormente la técnica evoluciona y se introducen modificaciones; así se utilizan balones de dilatación que se inflan en el tramo de estenosis con manómetros manuales durante 10-30 segundos. El balón produce la fractura de la placa con rotura de la íntima y elástica interna y sobredistensión de las fibras elásticas y células musculares lisas de la capa media con un aumento del calibre de la arteria. Con el tiempo se reepiteliza esta zona y se produce una proliferación miointimal que conduce a la curación de la zona dilatada.

El principal inconveniente de ésta técnica es la producción de embolismos distales tras la ruptura de la placa, riesgo de disección arterial, espasmo u oclusión.

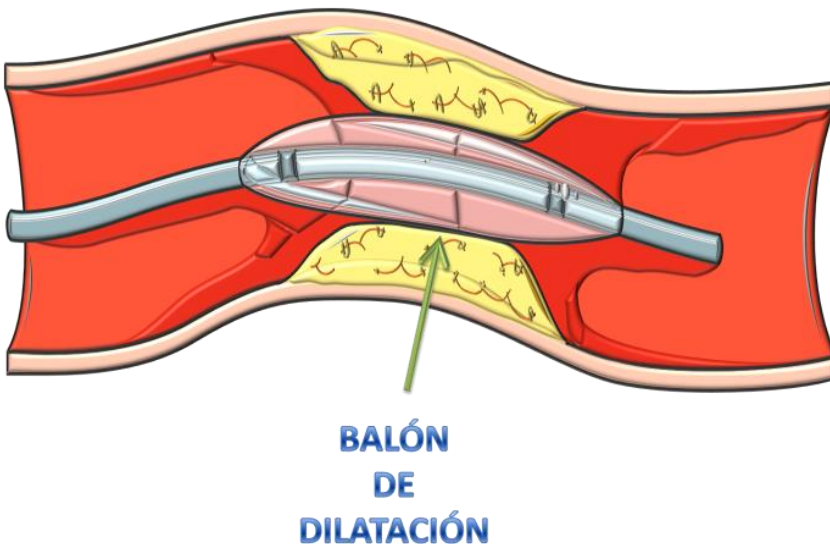


Ilustración 41. Representación de una ATP con balón de dilatación.

En 1984, Théron et al [279] desarrolla la angioplastia con protección cerebral que utiliza un sistema coaxial. Consiste en la oclusión temporal de la carótida interna con un balón de látex colocado por encima de la estenosis con el fin de evitar episodios embólicos. El balón distal se dilata e inmediatamente después se infla el balón de ATP, posteriormente se retira éste balón y se aspiran el detritus desprendidos en la fractura la placa antes de desinflar el balón distal. En años posteriores se sustituye el látex con el que estaba realizado el balón de protección por silicona [280]. Esta técnica tiene mayor duración que la ATP sin protección por lo que aumenta el tiempo de isquemia cerebral.

Con el tiempo esta técnica se depura, aparecen las prótesis endovasculares o stents, de diferentes materiales, longitud y características; comenzando la práctica del stenting de la arteria carótida (CAS). Se desarrollan stents y catéteres específicos para uso carotídeo [281]. En la década de los 90, los más utilizados fueron el stent autoexpandible y el balón autoexpandible con stent [282]. Este último es utilizado para lesiones de pequeña longitud dada su dificultad para atravesar curvas y arterias arrosariadas. El modelo de stent INTEGRA esta especialmente diseñado para la arteria carótida por su flexibilidad y capacidad de adaptación a la pared vascular.

En los últimos años aparecen stents con distintas longitudes y diámetros, con mejores sistemas de liberación, con geometría en forma de malla, con guías más cortas y de fácil manejo que incrementan la seguridad de la técnica. El uso de stents disminuye el riesgo de ictus o muerte perioperatoria y disminuye significativamente el riesgo de reestenosis en el tiempo [283] .

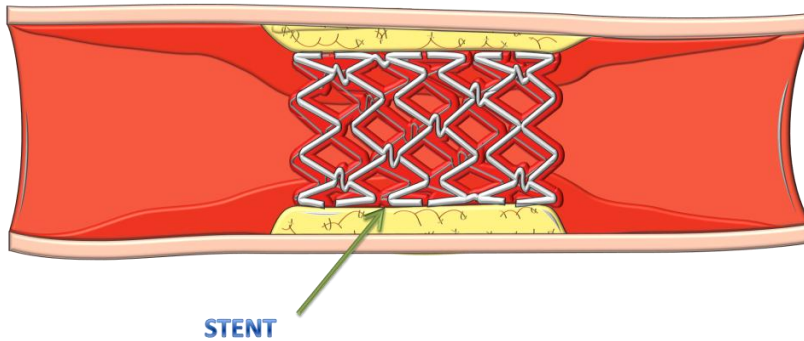


Ilustración 42. Representación del uso de stents en la revascularización por CAS.

Se publican series que utilizan de forma conjunta el uso de protección cerebral junto al uso de stent. Mejoran los sistemas de protección distal apareciendo filtros tipo paraguas fenestrados que, al expandirse, se anclan en la pared vascular permitiendo el paso del flujo sanguíneo cerebral y deteniendo el paso de detritus desprendido en la manipulación de la placa de ateroma, capturados al cerrarse el paraguas y ser englobados por una vaina.

Actualmente, se coloca un catéter en la ACE ipsilateral, el catéter guía progresa desde la arteria carótida común a la carótida interna, se introduce a través de él el balón de protección distal o filtro, posteriormente se introduce el stent autoexpandible con o sin dilatación previa, en función del grado y tamaño de la estenosis, y se realizan dilataciones posteriores hasta restablecer el diámetro de la luz arterial y el stent queda bien implantado en la íntima arterial.

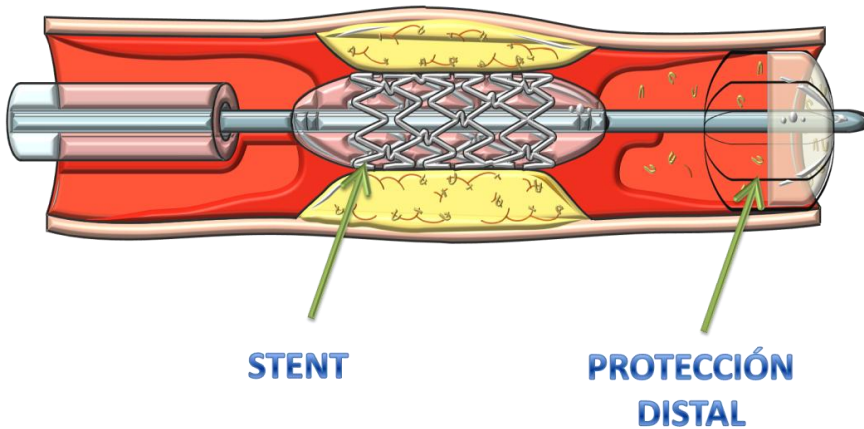


Ilustración 43. Representación del procedimiento actual de CAS.

El mayor riesgo del CAS es la ruptura de la placa con el balón de dilatación, la embolización distal, disección de la pared arterial y/o oclusión arterial. Son también complicaciones frecuentes la inestabilidad hemodinámica, el síndrome de hiperperfusión, la deformación del stent o trombosis de éste y la reestenosis tardía. El uso de stents hace que disminuyan algunas de éstas complicaciones.

En la actualidad, el tratamiento endovascular de la estenosis carotídea con el uso de ATP con o sin colocación de stent y/o protección distal se propone como una alternativa a la cirugía [284, 285].

Indicaciones

El CAS es una alternativa razonable a la CEA; particularmente en pacientes de alto riesgo para CEA. Aunque no hay estudios aleatorizados comparando

el CAS, con y sin dispositivos de protección embólica; el uso de estos parece ser importante en la reducción del riesgo de ictus. En la actualidad no existen suficientes evidencias que apoyen el CAS en pacientes de alto riesgo con estenosis asintomáticas menores del 80%, ni en pacientes sin factores de riesgo [224, 225, 286]. Los ensayos clínicos activos en la actualidad son necesarios para definir el papel en el futuro del CAS en pacientes de bajo riesgo; así como para determinar los beneficios de CAS frente al tratamiento médico.

Elección del mejor tratamiento

Tratamiento médico versus revascularización

El principal objetivo del tratamiento es minimizar el riesgo de ictus o muerte debido a enfermedad carotídea extracraneal. La elección entre tratamiento médico y revascularización debe estar basada en la valoración del riesgo de ictus en el tiempo y el riesgo de ictus debido a la revascularización.

En pacientes tratados médicamente, el riesgo de ictus es más dependiente del estado sintomático y la severidad de la estenosis, mientras que en la revascularización, el riesgo de complicaciones graves relacionadas con el procedimiento (infarto agudo de miocardio –IAM-, ictus o muerte) es más dependiente de la presencia o ausencia de características de alto riesgo.

Independientemente de la posibilidad de revascularización, todos los pacientes deben recibir un tratamiento, incluyendo modificación de factores de riesgo aterosclerótico y tratamiento antiagregante [224, 225, 286].

El tratamiento médico por si solo está indicado en pacientes en los que el riesgo de revascularización es mayor que su beneficio, incluyendo pacientes que tienen bajo riesgo de ictus con tratamiento médico (estenosis sintomáticas menores del 50%, estenosis asintomáticas menores del 60%) y aquellos con alto riesgo de muerte o ictus derivado del procedimiento o por complicaciones excesivas para el operador.

Las guías actuales [225, 286] indican que la revascularización se puede indicar en pacientes con estenosis asintomáticas mayores del 60% o estenosis sintomáticas mayores del 50%, con un riesgo de revascularización menor del 3% ó del 5% respectivamente.

Revascularización en pacientes sintomáticos

La AHA y la “American Stroke Association” (ASA) publicaron recientemente una guía de recomendaciones para la revascularización en pacientes con estenosis carotídea sintomática [225]. Esta guía establece límites más elevados de severidad de estenosis para CEA en pacientes sintomáticos, en los que se espera tener mayor riesgo de complicaciones (edad avanzada, presencia de comorbilidades significativas) y/o menos beneficio (mujeres, AIT retinianos) después de CEA.

RECOMENDACIONES PARA REVASCULARIZACIÓN EN PACIENTES SINTOMÁTICOS

Pacientes con AIT reciente o ictus isquémico en los últimos 6 meses y estenosis de la arteria carótida grave (70-99%)

*Se recomienda la CEA por cirujano con tasa de mortalidad y morbilidad perioperatoria < 6.
Evidencia clase I, nivel A*

Pacientes con AIT reciente o ictus isquémico y estenosis de la arteria carótida moderada (50-99%)

*Se recomienda la CEA, dependiendo de factores específicos del paciente (edad, sexo, comorbilidades y gravedad de los síntomas iniciales)
Evidencia clase I, nivel A*

Grado de estenosis < 50%

*No hay indicación para CEA
Evidencia clase III, nivel A*

Cuando la CEA está indicada

*La intervención debe hacerse dentro de las 2 semanas siguientes
Evidencia clase IIa, nivel B*

Entre pacientes con estenosis sintomáticas graves (>70%) de difícil acceso quirúrgico, o cuando existen otras circunstancias específicas

*Debe ser considerado el CAS, al no ser inferior a la CEA
Evidencia clase IIb, nivel B*

El CAS está indicado cuando se realiza por personal cualificado

*El personal debe tener unas tasas de morbilidad y mortalidad perioperatorio entre 4-6%.
Evidencia clase IIa, nivel B*

Tabla 5. Recomendaciones para la revascularización de la AHA/ASA [226].

Revascularización en pacientes asintomáticos con bajo riesgo para CEA

El manejo de los pacientes con estenosis carotídea asintomática es muy importante, representando un elevado porcentaje de pacientes susceptibles de revascularización carotídea por CEA o CAS. En estos pacientes existen 2 puntos controvertidos relacionados con su manejo: uno relacionado con las evidencias de revascularización en general, y el otro con el límite de estenosis para su revascularización.

Los que se posicionan a favor de la revascularización creen que este tema queda resuelto con el Estudio de Aterosclerosis Asintomática Carotídea (ACAS) [254] y Ensayo de Cirugía en Carótida Asintomática (ACST) [255], en los que queda demostrada la superioridad de la CEA y aspirina, comparados con

aspirina sola en pacientes con bajo riesgo de complicaciones quirúrgicas. En contra, los más conservadores sugieren que el ACAS está caduco, de forma que la modificación agresiva de factores de riesgo y el mejor tratamiento médico no se hace de rutina.

El otro punto de controversia es el límite adecuado de recomendación de CEA. Las guías de la AHA revisadas en 1998, modifican las recomendaciones en base a estos estudios; de forma que recomiendan la CEA en estenosis asintomáticas mayores del 60% para pacientes con riesgo quirúrgico menor del 3%, y para estenosis asintomáticas mayores del 75% para pacientes con riesgo quirúrgico del 3-5%. Cabe destacar que las guías de la AHA no indican claramente qué grado de estenosis debe ser juzgado por angiografía o técnicas no invasivas, a pesar de que la mayoría de ensayos aleatorizados de CEA se basan en angiografía de contraste y la mayoría de cirujanos se basan en dúplex carotídeo sin angiografía.

En la actualidad sólo se disponen de datos de ensayos clínicos aleatorizados para CEA. Por ello, son necesarios nuevos ensayos que comparen la CEA versus CAS, para demostrar la equivalencia o superioridad del CAS, convirtiéndolo en la técnica de elección en pacientes para bajo riesgo de CEA.

Revascularización en pacientes asintomáticos de alto riesgo para CEA

El manejo de estos pacientes asintomáticos con estenosis carotídeas graves con alto riesgo para CEA es controvertido; dado que han sido excluidos de los ensayos clínicos de CEA y de tratamiento médico. No existen datos suficientes en estos pacientes de alto riesgo para definir la historia natural

de la enfermedad tratada médicamente o quirúrgicamente respecto a la supervivencia a 5 años sin ictus; aunque los riesgos de la CEA son claramente más elevados que en pacientes de bajo riesgo. Además, los beneficios de la revascularización quedan anulados si el riesgo de revascularización es alto, y la CEA está asociada con mayores riesgos que pacientes sometidos al CAS.

En estos pacientes asintomáticos de alto riesgo el tratamiento médico es la mejor opción.

Edad

Con el aumento de edad existe un mayor riesgo de hipertensión sistólica, fibrilación atrial, aterosclerosis generalizada y ECV; que contribuyen a un riesgo elevado de ictus en la población anciana [287]. En estos pacientes, puede ser difícil valorar el riesgo relativo de cada factor, por lo que posiblemente sea necesaria la administración de múltiples tratamientos farmacológicos.

Para la prevención del ictus, está demostrado que el tratamiento médico con aspirina, beta bloqueantes, estatinas e inhibidores ACE es seguro y está bien tolerado; y estos agentes están asociados con una reducción de la morbilidad y mortalidad cardiovascular, incluso en ancianos. Sin embargo, los ancianos son de alto riesgo para CEA, y muchos estudios aleatorizados de CEA los excluían por esta razón. De acuerdo con estudios clínicos [288-290], el mejor tratamiento en pacientes ancianos con estenosis carotídea asintomática no es conocido; siendo razonable el tratamiento médico y la modi-

ficación de factores de riesgo. El tratamiento médico sólo debe considerarse en pacientes ancianos con esperanza de vida menor de 5 años. Para pacientes sintomáticos con esperanza de vida mayor de 5 años la revascularización está indicada, principalmente en hombres. La elección de la técnica de revascularización no está tan clara, aunque los datos disponibles sugieren que el CAS es más segura y menos invasiva que CEA.

Sexo

Mujeres mayores de 65 años, afroamericanas y diabéticas son las que presentan un mayor riesgo de aterosclerosis y de ictus en comparación con otras más jóvenes, caucásicas y no diabéticas; siendo recomendable la aspirina en la prevención primaria de estos grupos de alto riesgo. La discordancia en los beneficios de CEA para mujeres comparada con hombres parece que es debida a complicaciones de mayor riesgo en mujeres tras CEA [291]. Sin embargo, no se encuentran diferencias en el sexo, en ictus o muerte a 30 días ó 1 año después del CAS en los registros de alto riesgo. De este modo, los ensayos clínicos demuestran una mayor supervivencia sin ictus o muerte en mujeres con estenosis sintomáticas entre 70-99% [252, 253] tras CEA, y pequeños beneficios de la CEA en mujeres asintomáticas [255].

Proteómica

La conclusión del proyecto genoma humano [292] y de otros organismos [293, 294], así como el rápido desarrollo de bases de datos y algoritmos informáticos ha supuesto un gran impacto en la investigación biomédica. La disponibilidad de estas herramientas ha permitido la apertura de nuevas posibilidades para abordar determinadas cuestiones biológicas.

El estudio tradicional de un gen o una proteína se reemplaza por el estudio a gran escala de genes y proteínas en la era de la Genómica y la Proteómica.

Para llegar a entender los procesos moleculares que ocurren en diferentes estados de salud, es necesario conocer las vías de transducción de señales y las interacciones entre proteínas y otras moléculas que influyen en la función celular. También es necesario el conocimiento de las modificaciones postraduccionales de los productos génicos. Esta información no es inherente al conocimiento del genoma, por lo que es necesario recurrir al estudio del ARN_m o de las proteínas. Teniendo en cuenta que la correlación entre los niveles de ARN_m y las proteínas no llega al 50%, cabe pensar que el estudio del proteoma puede aportar información adicional [295, 296].

El proteoma de una célula o de un orgánulo proporciona información sobre el conjunto de proteínas expresadas en esa célula u orgánulo bajo unas condiciones fisiológicas y en un momento dado en el tiempo. La investigación del proteoma en distintos estados patológicos y su comparación con estados saludables permite la identificación de cambios moleculares que

pueden ser responsables de esos procesos [297, 298]. El análisis proteómico de distintos estados patológicos podría conducir a mejorar el conocimiento de las interacciones y de las funciones de las distintas proteínas.

La combinación de la información generada por la genómica y la proteómica, puede permitir el avance en la industria farmacológica proporcionando dianas terapéuticas más específicas, minimizando los efectos secundarios.

El término de proteoma fue introducido en 1995 por Wasinger et al. [299], para referirse al conjunto de proteínas codificadas por un genoma. A raíz de este término, surge también el de proteómica para referirse a la disciplina que se encarga del estudio del proteoma.

La proteómica se puede clasificar en tres tipos [300]:

- Proteómica de expresión: permite la separación e identificación de las proteínas expresadas por una célula, tejido u organismo. se puede comparar por ejemplo el patrón de expresión proteico de una muestra de un tejido sano y el patrón de una muestra de tejido enfermo.
- Proteómica estructural: se ocupa de describir la estructura de proteínas o complejos proteicos presentes en una localización celular u orgánulo. De esta forma se pueden identificar todas las proteínas de un compartimento dado, como por ejemplo la mitocondria, cloroplasto o núcleo.

- Proteómica funcional: pretende caracterizar las funciones de las proteínas integrando todos los datos disponibles.

La proteómica ofrece una nueva e interesante aproximación en la búsqueda de diferencias a nivel de expresión proteico. El examen de proteínas específicas a partir de extractos proteicos globales sin dianas candidatas previas, siguiendo un enfoque proteómico, puede ser muy útil.

Proteómica de expresión

Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2DE) es un método empleado para la caracterización de proteínas a gran escala y, combinado con la espectrometría de masas (MS), permite la identificación de un gran repertorio de proteínas [301, 302]. Las aplicaciones de la proteómica son numerosas en áreas de biología, bioquímica y biomedicina [303-305]. El uso de esta metodología en la búsqueda de marcadores relacionados con enfermedades [306, 307] ha resultado exitoso.

La 2DE es una técnica central en los análisis de proteómica. Se desarrolla por primera vez en 1975 por Patrick O'Farrell [301]. Mediante esta técnica las proteínas se someten a dos procesos de separación independientes; en una primera dimensión las proteínas se separan por su punto isoeléctrico y en una segunda dimensión se separan por su tamaño.

En un principio, en la primera dimensión el gradiente de pH para el isoelectroenfoque era generado por anfolitos transportadores libres (“carrier ampholites”). Los anfolitos crean un gradiente de pH inestable. Esta característica y la necesidad de utilizar siempre el mismo lote de anfolitos, los mismos reactivos y los mismos tampones para la primera dimensión, limitaba la reproducibilidad de los geles entre laboratorios.

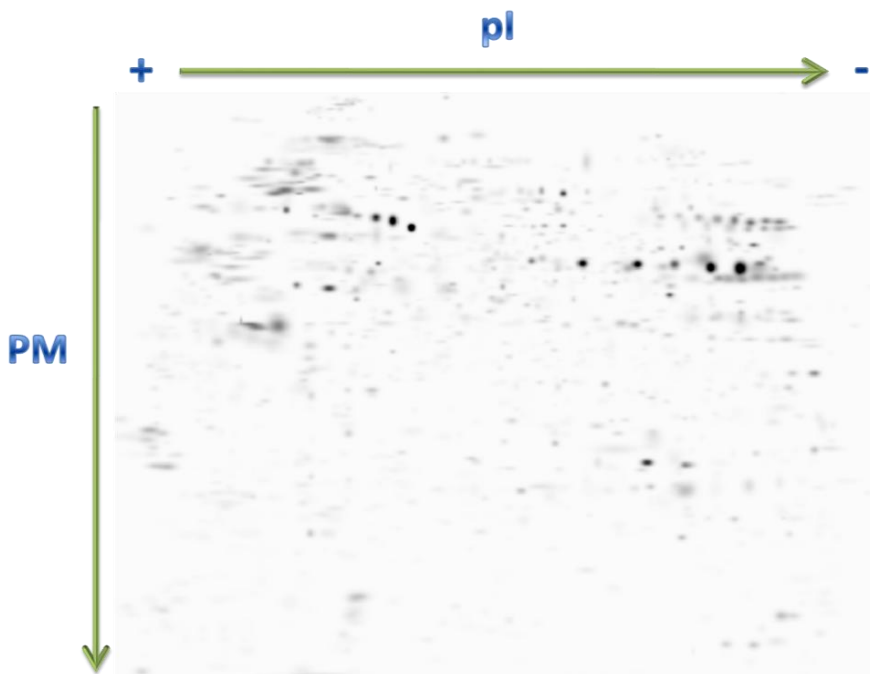


Ilustración 44. Representación de separación proteica por 2DE.

En 1982, se desarrolla una variante en la primera dimensión, las IPG [308], aunque el principal protocolo para el uso de esta técnica se debe al equipo de Görg [309]. Las IPG son tiras comerciales usadas para llevar a cabo la

primera dimensión, en las que el gradiente de pH está generado por inmóviles, unidas covalentemente a la matriz de acrilamida. De esta forma se consigue mejorar la reproducibilidad de la 2DE, además de incrementar la capacidad de carga. A partir de ese momento, con esta mejora, se extiende el uso de la técnica y hoy día es una técnica imprescindible en cualquier estudio de proteómica.

La 2DE también presenta una serie de limitaciones. Es una técnica laboriosa que requiere bastante tiempo. Las proteínas muy grandes e hidrofóbicas no entran fácilmente en el gel durante la primera dimensión y las proteínas muy ácidas o muy básicas no se resuelven bien. Algunos de estos problemas se pueden resolver mediante fraccionamiento, diferentes condiciones de solubilización y la utilización de IPG con diferentes rangos de pH. Otra limitación importante de la 2DE es la sensibilidad para detectar proteínas poco abundantes; algunas de las cuales son muy importantes, como proteínas reguladoras, proteínas implicadas en la transducción de señales o receptores.

Una vez separadas las proteínas en un gel de 2DE, deben ser visualizadas; para lo que se recurre a técnicas tradicionales de tinción de proteínas, teniendo en cuenta que posteriormente las proteínas deben ser analizadas por MS y, por tanto, la técnica de tinción utilizada debe ser compatible con cualquier análisis posterior. Además, se tienen en cuenta otros aspectos, como por ejemplo, si se quiere hacer una valoración cuantitativa de las proteínas o si únicamente basta con una valoración cualitativa. Las técnicas de tinción más comúnmente empleadas son la tinción de plata [310], la tinción

con azul de Coomassie, el uso de marcaje radiactivo o las tinciones fluorescentes que poseen rangos dinámicos mayores [311].

El análisis cualitativo de los geles una vez teñidos se puede hacer mediante un examen visual de los mismos. Por su parte, el análisis cuantitativo requiere la digitalización de las imágenes y su estudio un software específico (PDQuest, Melanie, ImageMaster, DeCyder).

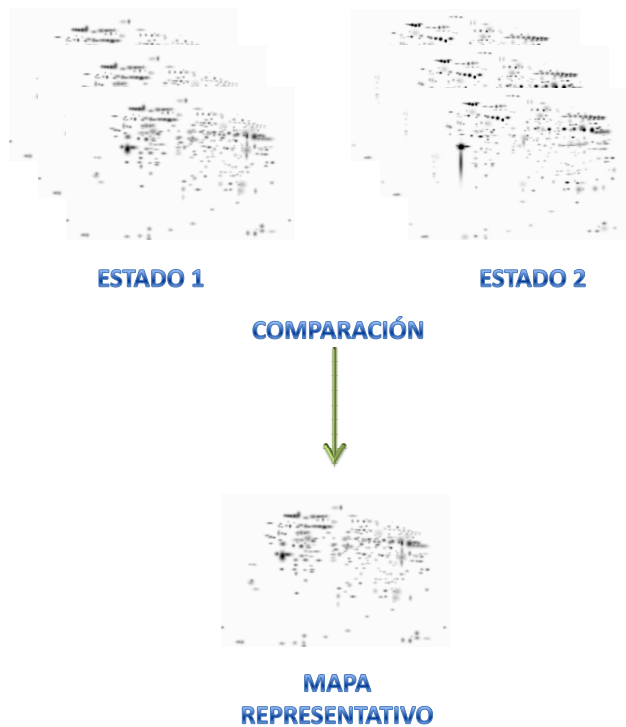


Ilustración 45. Representación de los pasos de un análisis de proteómica de expresión por 2DE.

En los últimos años ha surgido una modificación de la técnica de electroforesis bidimensional conocida como electroforesis de diferencia en gel (DIGE). Esta técnica de 2DE se basa en el marcaje fluorescente de las preparaciones proteicas a comparar, previamente a la separación por 2DE convencional. De este modo, hasta 3 muestras pueden ser marcadas y mezcladas para luego ser separadas [312-314]. Puesto que las muestras están expuestas a las mismas condiciones químicas y electroforéticas, la comigración de las mismas proteínas presentes en diferentes muestras está garantizada; simplificando el análisis de las diferencias respecto a los métodos convencionales.

Espectrometría de masas

Una vez separadas las proteínas es esencial su posterior identificación. Las proteínas pueden identificarse por diversos métodos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, la detección con anticuerpos específicos o el análisis de la composición de aminoácidos. Todos estos métodos son lentos, y por tanto no resultan apropiados para su utilización a gran escala.

Dada su rapidez, hoy en día se recurre a la espectrometría de masas para la identificación de proteínas [315].

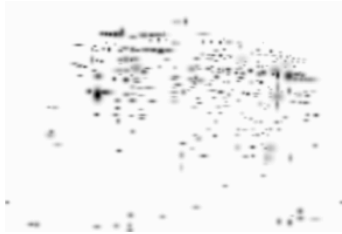
Para analizar las proteínas mediante espectrometría de masas deben convertirse primeramente en péptidos mediante proteólisis, generalmente con tripsina.

El análisis por espectrometría de masas implica:

1. La ionización suave de los péptidos mediante ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI), a partir de una muestra sólida; o la ionización electrospray (ESI) a partir de una muestra en solución.
2. Separación de los iones según su relación de masa/carga en un analizador de masas.
3. Fragmentación opcional de alguno de los iones peptídicos.
4. Medida de las masas en un detector, obteniendo el espectro de masas para proceder a la identificación de la proteína en bases de datos.

En el MALDI-TOF (tiempo de vuelo) la proteína se digiere con un enzima, normalmente tripsina, que la rompe específicamente en lisinas y argininas si no están unidas a prolina. La muestra se lleva a una placa metálica junto con la matriz. La matriz está formada por moléculas capaces de absorber energía, como por ejemplo el ácido 2,5-dihidroxibenzoico. La matriz y la muestra forman cristales sobre los que se hace incidir un rayo láser. De esta forma la matriz absorbe energía y actúa como donador de protones, provocando la ionización suave de los péptidos. Los iones peptídicos son acelerados en un campo eléctrico y posteriormente pasan a una zona de vuelo libre hasta llegar a un detector. El detector analiza el tiempo de vuelo de los iones, que es proporcional a su relación de masa/carga. De esta forma pueden llegar a identificarse las masas de los distintos péptidos. Se obtiene, así, una relación numérica creciente, indicativa de las masas de los péptidos procedentes de

la digestión de la proteína que se denomina: “huella peptídica”. Estas masas del procedimiento experimental se comparan con las masas de la digestión teórica de las proteínas presentes en una base de datos. A raíz de esta comparación puede llegar a identificarse la proteína.



ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN

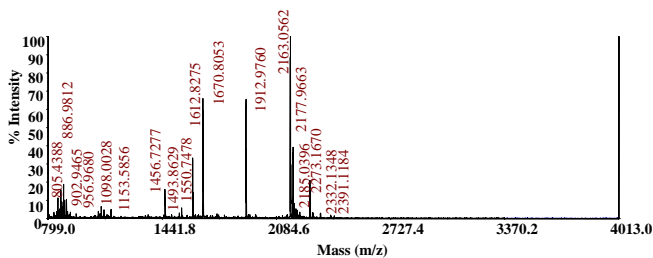


Ilustración 46. Representación de la identificación por MS de los spots de 2DE.

No obstante, el MALDI-TOF también presenta sus limitaciones:

- la ionización de los péptidos es selectiva y no cuantitativa, por lo que puede haber algunos péptidos que no sean detectados.
- si la cantidad de proteína en el gel es pequeña, el número de péptidos analizados puede ser también pequeño y por tanto la proteína puede no ser identificada.
- el MALDI-TOF no es útil para identificar mezclas proteicas y en algunos casos un solo spot de un gel de 2DE puede englobar a más de una proteína. Aún así la resolución de la 2DE mejora la separación de la 1DE en la que en una sola banda puede haber varias proteínas.

En algún caso, estos problemas pueden resolverse mediante la secuenciación de alguno de los péptidos. Para ello se usa un MS en tándem, como por ejemplo un MALDI-TOF-TOF. En este caso, se hace un primer análisis de masas y se selecciona un ión por la masa. Este se fragmenta por colisión con un gas inerte, de forma que los fragmentos se diferencian en un solo aminoácido. El segundo análisis de masas nos indica la masa de estos fragmentos en forma creciente. Debido a que las masas varían en un solo aminoácido se puede descifrar la secuencia del péptido seleccionado. Utilizando la huella peptídica y la secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos puede llegar a identificarse, de forma inequívoca, la proteína en una base de datos. Puede haber la posibilidad de que, aún así, la proteína no llegue a identificarse;

en ese caso la única alternativa será la secuenciación completa de la proteína [316].

Otras técnicas

La 2DE acompañada de la espectrometría de masas son las técnicas fundamentales en cualquier estudio de proteómica. A parte de éstas, existen otras técnicas que surgen principalmente como alternativa a la 2DE, entre las que destacan la cromatografía multidimensional, el “Isotope Coded Affinity Tag” (ICAT) y los arrays de proteínas.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es otra opción para la separación de las proteínas. Esta técnica permite la separación e identificación de centenares de proteínas en un único experimento [316]. Se trata de una técnica analítica que separa las moléculas en función del tipo de soporte que se utilice. Normalmente se combinan dos tipos diferentes de cromatografía mediante la conexión de dos columnas. La primera es de cambio iónico, para la separación por carga, y la segunda es de fase reversa para la separación por hidrofobicidad [317]. Una vez obtenido el extracto proteico se digiere con una proteasa, normalmente tripsina. La cromatografía multidimensional se puede conectar directamente a MS, lo que permite la identificación de los péptidos y de las proteínas de las que proceden según van eluyendo de la columna cromatográfica [318].

La técnica ICAT se basa en el marcaje isotópico diferencial; permitiendo la determinación de la cantidad de proteína relativa entre dos muestras [319]. Las proteínas procedentes de dos muestras distintas se marcan con el reac-

tivo ICAT. Éste se une específicamente a los residuos de cisteína, y va unido a biotina para llevar a cabo la purificación en un sistema con avidina. Existen dos reactivos ICAT distintos, uno lleva el isótopo ligero y el otro el pesado. Cada uno de estos reactivos se usa para marcar una de las dos muestras diferentes. Las proteínas son digeridas por proteólisis y la mezcla de péptidos de las dos muestras se somete a una cromatografía de afinidad que utiliza avidina. Finalmente los péptidos se someten a identificación por MS. Los péptidos procedentes de cada una de las muestras se diferencian en 8 Da de peso molecular; y de esta forma se pueden ver las diferencias de expresión proteica entre dos muestras sin necesidad de recurrir a la 2DE [315].

La técnica de los arrays o chips de proteínas utiliza una superficie en la que se unen un cierto grupo de proteínas basado en una propiedad física específica como hidrofobicidad o carga, entre otras. Una pequeña cantidad de muestra biológica sin procesar, tal como suero o extracto proteico, es aplicada directamente sobre la superficie, se incuba y lava, de forma que se retienen las proteínas específicas o las clases proteicas elegidas. El chip proteico se somete a un análisis de masas por un lector (SELDI-TOF: “Surface Enhanced Laser Desorption Ionization”), que tiene la misma base de funcionamiento que el MALDI-TOF, generando patrones de masas de las proteínas unidas; de forma que pueden ser identificadas mediante el uso de bases de datos [320].

Importancia biomédica

A través de la electroforesis bidimensional es posible el estudio comparativo, a nivel cualitativo y cuantitativo, de la expresión proteica en muestras que difieren en alguna variable [303, 306]; de forma que la aparición o desaparición de spots proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas, y la intensidad de los spots permite conocer los niveles de expresión de las mismas; de forma que es posible identificar biomarcadores asociados a determinadas enfermedades o estadios biológicos [321, 322].



Ilustración 47. Utilidad de la proteómica en la búsqueda de biomarcadores.

En los últimos años, la investigación en proteómica clínica aplicada a la búsqueda de biomarcadores se ha visto incrementada [323]; aplicándose esta tecnología en una gran variedad de estudios clínicos en cáncer [324], enfermedades cardiovasculares [305] y enfermedades neurológicas [325]. La proteómica de expresión también fue empleada para caracterizar la expresión proteica durante la fase aguda del ictus isquémico en ratas [326] y para tratar de dilucidar los procesos de plasticidad y recuperación neuronal tras el ictus isquémico en modelos experimentales [322].

Por lo tanto, la proteómica posee un gran potencial para el descubrimiento de nuevos biomarcadores o bien nuevas dianas terapéuticas. De este modo, la identificación y descripción de las alteraciones del proteoma de las placas de ateroma de pacientes bajo diferentes grados de inflamación sistémica permitirá un mejor conocimiento de su actividad y de su fisiopatología [327, 328], posibilitando la intervención sobre la misma.

HIPÓTESIS

Tradicionalmente, la progresión y complicación de la placa de ateroma se cree que está determinada por factores de la biología de la placa (composición, estructura) así como por diversos procesos interactuantes. Sin embargo, estudios recientes parecen demostrar la influencia en la progresión y complicación de estas lesiones del ambiente sistémico en el cual se desarrollan.

Por ello, la hipótesis de trabajo postula que:

“existen alteraciones cualitativas y/o cuantitativas en los niveles de expresión proteicos del material biológico recogido en los dispositivos de protección distal (DPD) de CAS, de placas de ateroma sintomáticas expuestas a diferentes condiciones de inflamación sistémica”

OBJETIVOS

Objetivo principal

- Identificar marcadores de naturaleza proteica asociados a placa de ateroma sintomática en relación con la inflamación sistémica.

Objetivos secundarios

- Identificar y describir los cambios en la expresión proteica de los diferentes subtipos de placa de ateroma en su contexto fisiopatológico.
- Validar los DPD como nueva vía para el estudio de la aterosclerosis.

JUSTIFICACIÓN

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. Dentro de los subtipos de ictus isquémicos, el de origen carotídeo da cuenta de un 25% de los ictus isquémicos totales.

La ruptura de la placa de ateroma carotídea, con la consiguiente exposición de material protrombótico a la luz del vaso, es la responsable de los procesos trombóticos causantes de la oclusión; y por tanto, del bloqueo del flujo sanguíneo cerebral en la zona afectada.

Sin embargo, el avance en el manejo de los factores de riesgo de la enfermedad aterosclerótica y en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la formación e inestabilización de la lesión, no ha supuesto una mejora en la discriminación de sujetos con riesgo de experimentar un episodio cerebrovascular. Del mismo modo, las técnicas de imagen actuales, empleadas para el estudio de la placa de ateroma, carecen de este valor predictivo.

Así, el conocimiento de los cambios morfológicos, celulares y metabólicos de la placa aterosclerótica es fundamental para la comprensión de los procesos que tienen lugar en la ruptura de la placa de ateroma, y por extensión en el ictus isquémico de origen aterotrombótico.

Por ello, se plantea necesaria la identificación de biomarcadores con valor pronóstico y diagnóstico, definiendo aquellas lesiones vulnerables, susceptibles de ruptura; para estratificar grupos de pacientes en función del tratamiento preventivo de las manifestaciones clínicas de aterosclerosis.

PACIENTES Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

Se incluyeron prospectivamente pacientes con estenosis carotídea susceptible de revascularización según el “Protocolo de Actuación en Enfermedad Carotídea”, de la Sección de Neurovascular y Sección de Neurorradiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Hospital Universitario de la Princesa de Madrid, Hospital Universitario Doctor Josep Trueta de Girona y del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona

La inclusión de pacientes sometidos a revascularización por CAS fue realizada por el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y por el Hospital Universitario de la Princesa de Madrid.

La inclusión de pacientes sometidos a revascularización por CEA fue realizada por el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, el Hospital Universitario Doctor Josep Trueta de Girona y por el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona.

A todos los pacientes les fue proporcionada la información del proyecto por escrito y firmaron un consentimiento escrito.

Criterios de selección

Fueron seleccionados aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes con estenosis carotídea susceptible de revascularización.
- Edad mayor de 18 años.

Criterios de exclusión

- Pacientes con enfermedad sistémica (enfermedad inflamatoria crónica y/o proceso infeccioso agudo).
- Pacientes a los que no se les pudo obtener la muestra biológica.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Estenosis carotídea susceptible de revascularización	Enfermedad sistémica
Edad mayor de 18 años	No poder obtener la muestra biológica

Tabla 6. Criterios de selección para el estudio.

Grupos de estudio

Los pacientes incluidos fueron clasificados en función de la sintomatología de la placa y de la condición de inflamación sistémica.

Las placas de ateroma fueron consideradas sintomáticas cuando resultaron en manifestación clínica, en este caso como causa de un ictus de origen aterotrombótico o AIT.

La condición de inflamación sistémica fue valorada por niveles de PCR-us (ultrasensible) en suero. Diversos estudios han comprobado que los niveles de PCR-us son marcadores independientes de ictus, definiendo un estado de riesgo elevado cuanto más elevados son estos [329]; además de ser relacionados con la intensidad y progresión de la aterosclerosis [166]. En base a guías internacionales [330], niveles de PCR-us superiores a 3mg/L reflejan un estado inflamatorio sistémico, afectando a la estabilidad de la placa de ateroma y relacionándose con un mayor riesgo de episodios vasculares; mientras que niveles de PCR-us inferiores a 3mg/L reflejan una ausencia de inflamación sistémica, relacionándose con un menor riesgo de episodios trombóticos.

De este modo, los grupos de estudio propuestos fueron los siguientes:

- placa sintomática con inflamación sistémica (PCR-us > 3 mg/L)
- placa sintomática sin inflamación sistémica (PCR-us ≤ 3 mg/L)

PLACA SINTOMÁTICA	INFLAMACIÓN SISTÉMICA
-------------------	-----------------------

Sí	Sí ([PCR-US] > 3 mg/L)
----	------------------------

Sí	No ([PCR-us] ≤ 3 mg/L)
----	------------------------

Tabla 7. Grupos de estudio propuestos.

Evaluación clínica

A todos los pacientes les fue realizada la evaluación clínica rutinaria para el diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. En su caso, a la llegada al servicio de urgencias les fue realizada una TC que permitió el diagnóstico de ictus isquémico.

Clasificación etiológica

En el caso de placas de ateroma sintomáticas, los ictus fueron clasificados etiológicamente según los criterios TOAST [7] en:

- Aterotrombóticos
- Cardioembólicos
- Lacunares
- Indeterminados

Evaluación ultrasonográfica

El estudio ultrasonográfico habitual en pacientes con sospecha de enfermedad carotídea obstructiva fue realizado con un ecodoppler color de alta definición (APLIO 70) con el siguiente protocolo:

- Estudio de ambas carótidas en modo B (corte longitudinal), prestando atención en:
 - Análisis del grosor íntima media.
 - Análisis del tipo de placa: especificando la localización, morfología (regular/irregular) y tipo de placa.

GROSOR ÍNTIMA MEDIA	ESTRATIFICACIÓN
0 -0,9 mm	Normal
0,9 -1,5 mm	Engrosamiento
> 1,5 mm	Placa

Tabla 8. Estratificación del grosor íntima-media.

TIPO DE PLACA	DESCRIPCIÓN
Grado 1	Uniformemente anecogénica con un fino casquete ecogénico
Grado 2	Predominantemente anecogénica con pequeñas áreas anecogénicas (< 25%)
Grado 3	Predominantemente ecogénica con pequeñas áreas anecogénicas (< 25%)
Grado 4	Uniformemente ecogénica
Grado 5	Calcificada

Tabla 9. Clasificación del tipo de placa según su ecolucencia.

- Estudio de ambas carótidas y vertebrales en modo eco-doppler color (longitudinal y axial).
- Valoración del grado de estenosis siguiendo criterios aprobados en guías internacionales.

GRADO DE ESTENOSIS	PARÁMETROS PRIMARIOS		PARÁMETROS SECUNDARIOS	
	VSM ACI (cm/s)	ESTIMACIÓN DE PLACA	RATIO ICA/CCA	VDM ACI (cm/s)
Normal	< 125	Ninguna	< 2	< 40
< 50%	< 125	< 50	< 2	< 40
50-69%	125-230	≥ 50	2-4	40-100
≥ 70%	> 230	≥ 50	> 4	> 100
Suboclusión	Muy alto, muy bajo	Visible	Variable	Variable
Oclusión	Indetectable	No lumen	No aplicable	No aplicable

Tabla 10. Cálculo de estenosis en ACI.

- Valoración de la presencia de circulación colateral por arterias oftálmicas.
- Valoración de la circulación colateral intracraneal (anterior y posterior), así como la repercusión hemodinámica sobre la onda de flujo en arterias intracraneales. También identificación de las estenosis intracraneales en el caso de existir.
- Con la confirmación de una estenosis carotídea mayor del 50% que cumpla con los criterios intervencionistas se procederá a la realización de una angiografía diagnóstica.

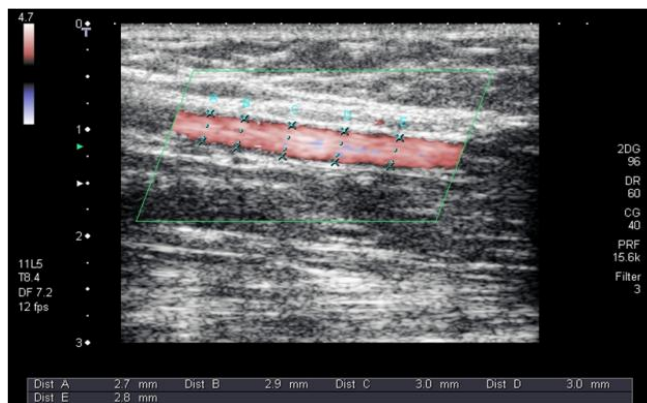


Ilustración 48. Estudio del grosor íntima media de la ACI por doppler.

Evaluación radiológica

En aquellos pacientes con una estenosis carotídea confirmada mayor del 50% cumpliendo con los criterios intervencionistas, se procedió con el siguiente protocolo:

- Determinación del grado estenosis y la extensión de la placa mediante estudio angio-TC.
- Cálculo automático de estenosis y posterior determinación del stent a colocar mediante angiografía digital en 3D (biplano LCN + G.E.).

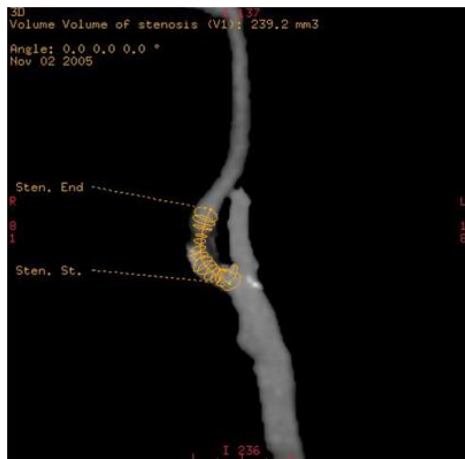


Ilustración 49. Angiografía digital para el cálculo del stent a colocar.

- Realización del procedimiento intervencionista con protección cerebral atendiendo a:
 - la facilidad de localización y apertura del filtro.
 - la confortabilidad y estabilidad.
 - los movimientos del filtro durante el stenting.
 - la presencia o no del espasmo.
 - la facilidad en la retirada del filtro.
- Recogida del filtro.



Ilustración 50. Revascularización por CAS con uso de DPD.

Evaluación intervencionista

Indicaciones de endarterectomía carotídea

- Pacientes con estenosis sintomática de origen ateromatoso:
 - Estenosis $\geq 70\%$.
 - Estenosis entre 50-70% con AIT/ictus de repetición a pesar del tratamiento antiagregante y anticoagulante, u oclusión de la carótida contralateral.
- Pacientes con estenosis asintomática $\geq 70\%$ con oclusión de la ACI contralateral o que cumplan la mayoría de los siguientes criterios:
 - Lesiones silentes en la TC ó RM.
 - Estenosis $\geq 90\%$.

- Pacientes diabéticos.
- Estenosis que progresa en controles periódicos (6 meses).
- Repercusión hemodinámica en Doppler transcraneal (falta de colaterales, asimetría importante)
- Vasoreactividad claramente disminuida o exhausta.
- Placas ulceradas y/o hipoecogénicas (tipo I-II).
- Detección de émbolos positiva (30 min).

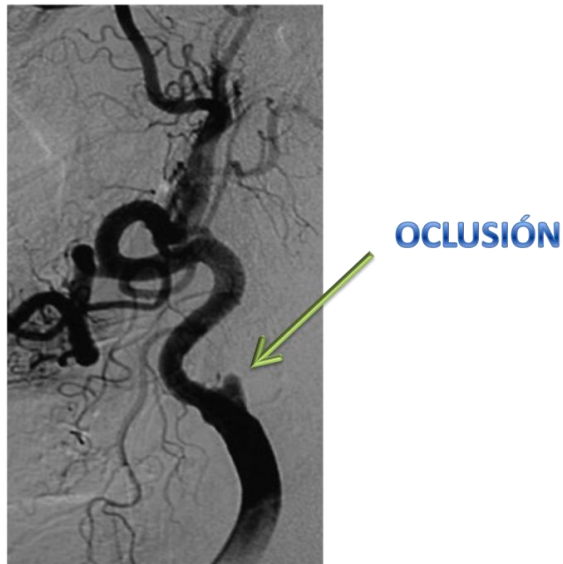


Ilustración 51. Angiografía de estenosis susceptible de revascularización.

Indicaciones de stenting carotídeo

- Aquellos pacientes en los que se desestima la endarterectomía:
 - Riesgo quirúrgico elevado (EPOC, cardiopatía isquémica previa).
 - Mayores de 80 años.
 - Estenosis carotídeas altas.
- Estenosis carotídeas post-radioterapia, reestenosis carotídea post-endarterectomía o post-ATP, disección de carótida, pseudoaneurisma o displasia fibrosa.

Evaluación molecular

Tras la obtención del consentimiento informado fue extraída una muestra de sangre venosa por flebotomía en el antebrazo, para la determinación de la [PCR-us]. La extracción constó de 1 tubo de 4,5 mL de bioquímica con separador, siguiendo el protocolo para la obtención de suero:

- Se dejan reposar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente para la formación del botón celular.
- Se centrifugan los tubos a 3.000 rpm. durante 10 min.
- Se reparte el suero en 2 alícuotas de 1 mL.
- Se congelan las 2 alícuotas a - 80 °C hasta la realización de los test moleculares.

Los niveles séricos de PCR-us fueron medidos por sistema de inmunodiagnóstico automatizado IMMULITE 1000 (DIPESA S.A.).

Evaluación proteómica

Tras los CAS fueron recogidos los DPD. Estos fueron almacenados debidamente identificados en arcón congelador a -80°C .

La ubicación de estas muestras fue registrada en la hoja de recogida de datos diseñada a tal efecto, siendo procesada en una base de datos junto con el resto de variables.

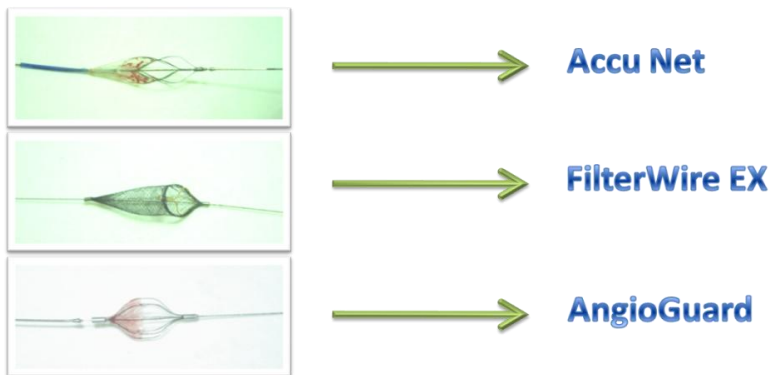


Ilustración 52. Tipos de DPD recogidos para el estudio.

El procesado de las muestras para su evaluación proteómica fue realizado siguiendo un protocolo específico.

Extracción de proteínas del material capturado en los DPD

Para llevar a cabo el estudio proteómico fue necesario extraer y solubilizar las proteínas presentes en la muestra para su posterior separación:

- Se deposita el filtro en un microtubo con 500 μ L de solución de lisis y se somete a varios pulsos de ultrasonidos de intensidad media en frío (para evitar la degradación de las proteínas) con el fin de romper las estructuras celulares.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Urea	7M
Tiourea	2M
CHAPS	4%
DTT	3%

Tabla 11. Solución de lisis. Se añaden inhibidores de proteasas para preservar las proteínas.

- Se dejan los microtubos en agitación durante 3 h a 29°C.
- Se centrifugan los microtubos durante 45 min. a 25°C para separar los restos celulares, dejando en suspensión las proteínas.
- Se concentran y purifican las proteínas mediante precipitación con acetona, añadiendo 2 volúmenes de acetona (1 mL) por 1 volumen de solución de lisis, dejando los microtubos durante 2 h. a -20°C.
- Se centrifugan los microtubos durante 45 min. a 4°C.
- Se descarta el sobrenadante y se dejan secar los microtubos durante varios min.
- Se resuspende el pellet con 200 μ L de solución de lisis en agitación durante 1h a 29°C.

- Se determina la concentración proteica de cada muestra mediante ensayo Bradford modificado [331], guardando los resultados en la base de datos.
- Se almacenan las muestras en arcón congelador a -80°C hasta su uso.

SOLUBILIZAR

Sonicación
Agitación
Centrifugación



CONCENTRAR

Precipitación
Centrifugación
Agitación



CUANTIFICAR

Ilustración 53. Esquema del procesado de las muestras para proteómica.

Electroforesis bidimensional

Primera dimensión

Una vez extraídas y solubilizadas las proteínas es necesario separarlas por su carga eléctrica como primer paso de la electroforesis bidimensional:

- Se centrifugan las muestras a 12000 g durante 30 min. a 20°C.
- Se cargan 20 µg de proteína en 400 µL de solución de rehidratación (con un 10% de exceso por las pérdidas de pipeteo).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Urea	7M
Tiourea	2M
CHAPS	4%
Azul de bromofenol	trazas
DTT	0,3%
Tampón IPG	0,5%

Tabla 12. Solución de rehidratación.

- Se cargan 200 µL de solución de rehidratación con las proteínas en la bandeja de 1DE, para cada tira IPG de 11 cm y pH 3-10 NL (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California); cubriendo cada tira con 2 mL de aceite mineral.
- Se procede a la separación en la primera dimensión en la cubeta de 1DE PROTEAN IEF CELL (Bio-Rad).
- Se congelan las tiras en arcón a -20 °C hasta su uso.

PASOS

Rehidratación activa a 50 V durante 12 h

Incremento lineal de voltaje:

250 V 15 min

8000 V 2:30 h

8000 ~ 35000 V

Finalizar a 45000 Vh

Tabla 13. Condiciones de la 1DE.

Segunda dimensión

El siguiente paso de la 2DE, una vez separadas las proteínas por su carga eléctrica, es separarlas por su peso molecular:

- Al finalizar la 1DE se equilibran las tiras IPG con solución de equilibrio: 5 mL/tira; durante 20 min./pase (DTT y iodoacetamida). De esta forma, las proteínas separadas en base a su punto isoeléctrico se cargan negativamente para su posterior separación por su peso molecular.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris	50mM
Urea	6M
CHAPS	30%
SDS	2%
DTT	10 mg/mL
Idoacetamida	25 mg/mL

Tabla 14. Solución de equilibrado. El DTT y la iodoacetamida se añaden antes de su pase.

- Se colocan las tiras IPG sobre los geles Criterion Precast Gels de 1 mm, 12.5% Tris-ClH (Bio-Rad), sellándolos con agarosa.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Electrolito	1X
Agarosa	0,5%
Azul de bromofenol	trazas

Tabla 15. Solución de sellado.

- Se carga el tampón de electroforesis (electrolito) TGS 1X en la cubeta de electroforesis Dodecca Cell (Bio-Rad) y en el reservorio superior de cada gel de 2DE, para transmitir la corriente eléctrica.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris	50mM
Glicina	384mM
SDS	0,2%

Tabla 16. Tampón de electroforesis 10X.

- Se procede a la separación proteica en base al peso molecular en la cubeta de 2DE, con agitación a 15°C.

PASOS

Transferencia a 2 W durante 45 min

Separación a 17 W hasta el final

Tabla 17. Condiciones de la 2DE. Se detiene cuando el frente de migración alcanza 1 mm del final.

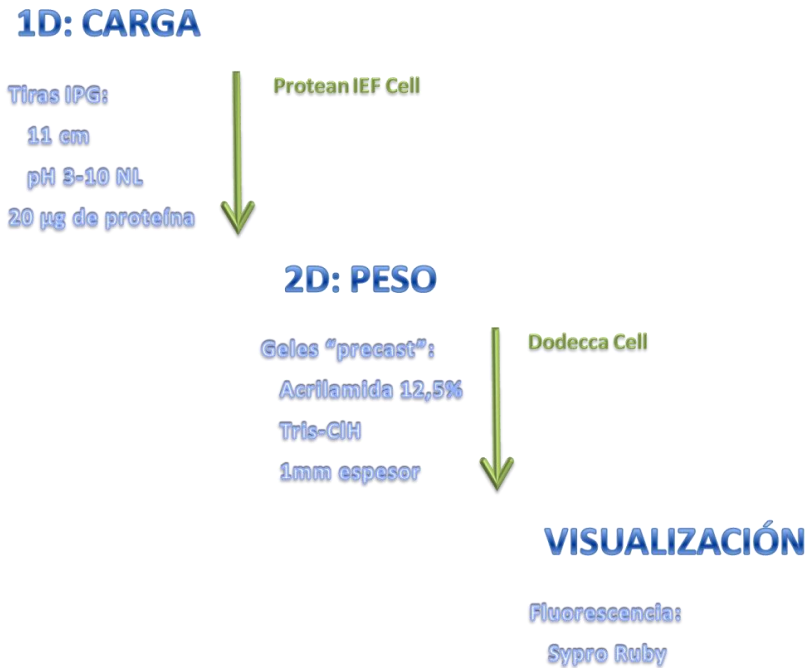


Ilustración 54. Esquema de la separación proteica por 2DE.

Tinción de los geles

Tras la separación de las proteínas, tanto por su carga como por su peso molecular, es necesaria la visualización de dichos patrones de migración.

La tinción de los geles analíticos (aquellos sobre los que se estudian las diferencias cualitativas y cuantitativas de los patrones de expresión) fue realizada con Sypro Ruby Fluorescent Dye (Bio-Rad):

- Al finalizar la 2DE se sacan los geles de los casetes que los contienen.

- Se sumergen los geles en solución de fijación durante 40 min. con agitación, de forma que las proteínas separadas se van a fijar a la malla del gel.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Etanol	40%
Ácido acético	10%

Tabla 18. Solución de fijación. Se ponen 200 mL/gel.

- Se hacen 3 lavados de los geles con agua ultrapura.
- Se sumergen los geles en Sypro Ruby (100 mL/gel) durante 3:40 h, con agitación y en oscuridad.
- Se sumergen los geles en solución de reducción de fondo de la tinción, durante 50 min. con agitación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Metanol	10%
Ácido acético	7%

Tabla 19. Solución de reducción de fondo. Se ponen 200 mL/gel.

- Se hacen 3 lavados de los geles con agua ultrapura.

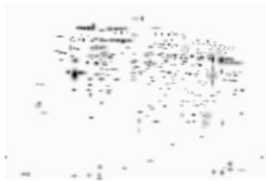
Digitalización de los geles

Una vez teñidos los geles, es necesario capturar y digitalizar los patrones de expresión proteica para poder llevar a cabo los análisis cuantitativos y/o cualitativos en los grupos de estudio:

- Se colocan los geles en la bandeja del Imager Fx Proplus (Bio-Rad).

- Se escanean los geles con el programa PDQuest (Bio-Rad), seleccionando tinción de proteínas Sypro Ruby en intensidad media.
- Se guardan las imágenes para su análisis.
- Se almacenan los geles en oscuridad a 4 °C envasados al vacío para evitar su degradación.

CAPTURA



Imager Fx ProPlus
PDQuest

ANÁLISIS



Ilustración 55. Esquema de la captura y análisis de los geles de 2DE.

Análisis de imagen

Una vez recogidas todas las imágenes de los geles, es necesario su análisis con software específico que va a permitir realizar de forma automática el análisis comparativo entre los grupos de estudio.

El análisis informático de los patrones 2DE fue llevado a cabo con el software PDQuest.

Detección de spots

Todas las imágenes fueron recortadas bajo el mismo patrón y sometidas a detección automática de spots; quedando incluidos todos los spots en un gel tipo denominado: gel maestro. Los geles fueron revisados uno a uno para corregir los errores de la detección automática, para a continuación realizar el emparejamiento automático de los spots. De la misma forma, los emparejamientos fueron revisados uno a uno corrigiendo los emparejamientos automáticos mal establecidos.

Reproducibilidad

Antes de proceder a la comparación de los patrones de 2DE, es necesario realizar estudios de reproducibilidad visuales e informáticos con el programa PDQuest, para verificar la fiabilidad de la técnica.

Primeramente fueron analizados los patrones de expresión de los 3 geles de cada una de las muestras en un análisis intraindividual, para establecer el patrón de expresión individual; eliminando las posibles variaciones de la técnica.

Seguidamente fueron analizados los patrones de los geles de cada grupo en un análisis interindividual, con el fin de establecer los patrones de expresión comunes a cada uno de ellos; eliminando las posibles variaciones biológicas individuales.

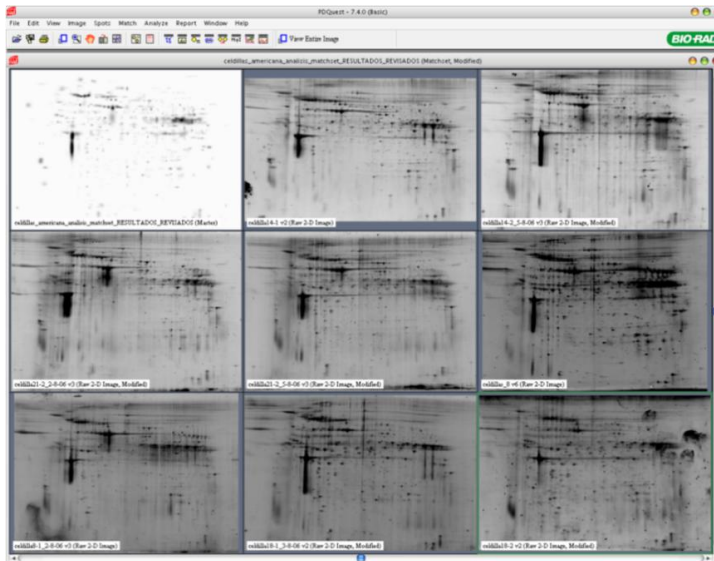


Ilustración 56. Pantalla de trabajo del programa PDQuest.

Estudio comparativo

Con los patrones de expresión proteica establecidos para cada uno de los grupos fue realizado el estudio comparativo, analizando las diferencias entre ambos grupos:

- Cualitativas: presencia/ausencia de spots en uno de los grupos.
- Cuantitativas: niveles de expresión de los spots 4 veces superior en un grupo respecto al otro.

También fueron analizadas la reproducibilidad cualitativa y cuantitativa para garantizar la fiabilidad de las comparativas a realizar en el estudio.

Análisis por espectrometría de masas

Como último paso del estudio de proteómica es preciso identificar las proteínas halladas de interés.

La identificación de las proteínas con expresión diferencial entre los grupos de estudio fue llevada a cabo en la Unidad de Proteómica del Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, mediante espectrometría de masas.

Para esta identificación fueron necesarios geles preparativos, para aislar una o varias proteínas en alta concentración para someterlas posteriormente al análisis por espectrometría de masas. La carga proteica de estos geles fue mayor que en los geles analíticos, siendo aproximadamente de 500 μ g, y la tinción se realizó con azul de Coomassie coloidal:

- Se sumergen los geles en solución de Coomassie Blue Brilliant R-250, durante 3 h. con agitación; para la tinción y fijación de las proteínas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Coomasie blue brilliant R-250	0,1%
Etanol	40%
Ácido acético	10%

Tabla 20. Tinción de Coomassie. Se ponen 200 mL/gel.

- Se sumergen los geles en solución de destinción, en varios pases con agitación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Etanol	30%
Ácido acético	10%

Tabla 21. Solución de destinción.

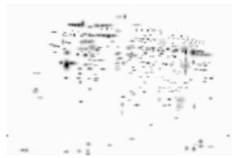
- Se sumergen los geles en agua destilada toda la noche para intensificar los spots.

Los spots fueron recogidos empleando una punta de pipeta estéril, y depositados en microtubos con agua ultrapura para su posterior envío e identificación por MS en la Unidad de Proteómica:

- Las proteínas se reducen en gel, se alquilatan y digieren con tripsina [332].
- El sobrenadante se recoge, y 1 μ L de este se deposita en un chip del MALDI, dejándolo secar a temperatura ambiente; para posteriormente añadirle la matriz.
- Los análisis se realizan en un espectrómetro de masas 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Foster City, California), para obtener la huella peptídica.
- Para la identificación proteica se usan las bases de datos del NCBI o Swisprot con MASCOT 1.9 (matrixscience.com) a través de Protein Global Server v3.5 (Applied Biosystems).

- La puntuación obtenida de las probabilidades deben ser mayores que la puntuación fijada como significativa con un valor p menor de 0,05.

COMPARATIVA



PDQuest
Maldi-TOF

IDENTIFICACIÓN

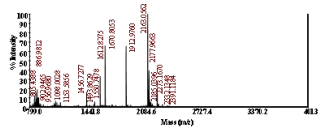


Ilustración 57. Esquema de la identificación por MS.

Evaluación inmunohistoquímica

Una vez identificadas las proteínas de interés es preciso validar los resultados obtenidos.

La confirmación de los resultados encontrados por proteómica fue llevada a cabo mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a las proteínas de interés en placas de ateroma procedentes de CEA:

INMUNÓGENO	TIPO	ORIGEN	CASA COMERCIAL
GSTK1	Policlonal	Conejo	Abcam PLC (Cambridge, UK)
NP	Policlonal monoespecífico	Conejo	Atlas Antibodies AB (Stockholm, Sweden)
ANXA5	Policlonal	Conejo	Proteintech Group Inc (Chicago, Illinois)
TAGLN2	Policlonal	Conejo	Proteintech Group Inc (Chicago, Illinois)

Tabla 22. Anticuerpos 1^{arios} empleados para la inmunohistoquímica.

- Se descongelan gradualmente las placas para mantener intactas las estructuras celulares:
 - -80 °C, -20 °C, 4 °C
- Se fijan los tejidos durante 24 h en solución de formalina al 10%.
- Se incluyen en bloques de parafina.
- Se realizan secciones de 4 µm que se montan en portaobjetos tratados, con carga positiva.
- Se desparafinan y rehidratan mediante pases de 3 min. de duración:
 - Xilol – Xilol – Xilol - Alcohol 100°- Alcohol 100° - Alcohol 96° - Alcohol 96°
- Se lavan en agua ultrapura durante 3 min.
- Se someten a diferentes pretratamientos para mejorar la inmunotinción:
 - microondas TE, a potencia de 700W durante 20 min.
 - baño María TE, a 95-99°C durante 20 min.

ANTICUERPO	PRETRATAMIENTO	DILUCIÓN
Anti-NP	Microondas + TE	1:100
Anti-ANXA5	Microondas + TE	1:50
Anti-TAGLN2	Microondas + TE	1:50
Anti-GSTK1	Baño maría + TE	1:100

Tabla 23. Pretratamientos y diluciones de los anticuerpos.

- Se enfrían a temperatura ambiente durante 20min.
- Se lavan en agua durante 3 min.
- Se incuban con el anticuerpo 1^{ario} durante 30min. a t^a ambiente.
- Se hacen 2 lavados con TBST durante 3 min /lavado.
- Se lavan con agua oxigenada al 3% durante 10min. a t^a ambiente.
- Se hacen 2 lavados con TBST durante 3 min. /lavado.
- Se incuban con un kit universal de anticuerpo 2^{ario} que emplea un polímero de dextrano conjugado con peroxidasa (Dako EnVision Peroxidase/DAB; Dako, Glostrup, Denmark) durante 30min. a t^a ambiente
- Se hacen 2 lavados con TBST durante 3 min./lavado.
- Se lavan con diaminobenzidina durante 10min. a t^a ambiente
- Se lavan en agua durante 5 min.
- Se tiñen con hematoxilina de Harris durante 1 min.
- Se lavan en agua 5 min.
- Se deshidratan mediante pases de 3 min. de duración:
 - Alcohol 96° - Alcohol 96° - Alcohol 100°- Alcohol 100° - Xilol – Xilol – Xilol

- Se montan con resina sintética.
- Se analizan con microscopía óptica.

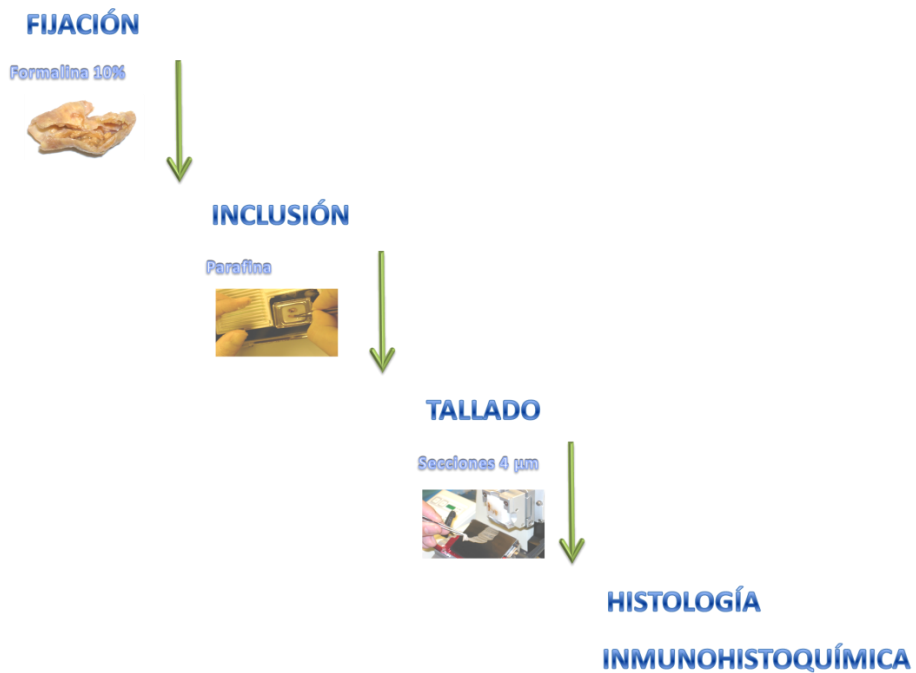


Ilustración 58. Esquema de la evaluación anatomopatológica.

La puntuación de los resultados inmunohistoquímicos fue llevada a cabo según protocolo de García- González [333]:

- Se seleccionan al menos 5 campos representativos
- Basándose en el porcentaje de células inmunopositivas se realizan 3 subdivisiones:
 - Positiva difusa: más del 50% de las células son positivas.

- Positiva heterogénea: entre el 10-49% de las células son positivas.
- Negativa: menos del 10% de las células son positivas. La inmunointensidad confusa se considera también como negativa.

Para la correcta valoración de las preparaciones inmunohistoquímicas fueron realizadas tinciones en tejidos conocidos por su positividad frente a cada uno de los anticuerpos ¹arios.

ANTICUERPO	TEJIDO CONTROL
Anti-NP	Amígdala sana
Anti-ANXA5	Carcinoma de pulmón
Anti-TAGLN2	Adenocarcinoma de colon
Anti-GSTK1	Hígado sano

Tabla 24. Controles positivos de los anticuerpos.

Evaluación histológica

A su vez, es necesario hacer el estudio histológico con el fin de caracterizar los tejidos de estudio.

La clasificación histológica de las placas de ateroma fue llevada a cabo siguiendo guías internacionales [83, 193], empleando tinción de hematoxilina-eosina:

- Se descongelan gradualmente las placas/DPD para no romper las estructuras celulares:
 - -80 °C, -20 °C, 4 °C
- Se fijan los tejidos durante 24 h. en solución de formalina al 10 %.
- Se incluyen en bloques de parafina.
- Se realizan secciones de 4 µm que se montan en portaobjetos tratados, con carga positiva.
- Se desparafinan y rehidratan mediante pases de 3 min. de duración:
 - Xilol – Xilol – Xilol - Alcohol 100°- Alcohol 100° - Alcohol 96° - Alcohol 96°
- Se lavan en agua ultrapura durante 3 min.
- Se tiñen con hematoxilina-eosina:
 - se sumergen en hematoxilina durante 5 min.
 - se lavan con agua destilada por inmersión en 2 pases y con agua corriente durante 1 min.
 - se sumergen en eosina 1 min.
- Se deshidratan mediante pases de 3 min de duración:
 - Alcohol 96° - Alcohol 96° - Alcohol 100°- Alcohol 100° - Xilol – Xilol – Xilol
- Se montan con resina sintética.
- Se analizan con microscopía óptica.

RESULTADOS

Análisis descriptivo

Un total de 23 pacientes sintomáticos sometidos a CAS con DPD, fueron incluidos en el estudio. De estos, 15 fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión; disponiendo de 8 DPD de protección distal para el estudio proteómico:

- *Grupo 1*: placa sintomática y ausencia de inflamación sistémica ([PCR-us] \leq 3 mg/L); (n=4).
- *Grupo 2*: placa sintomática e inflamación sistémica ([PCR-us] $>$ 3 mg/L); (n=4).

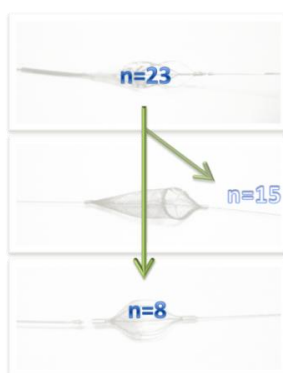


Ilustración 59. Sujetos del estudio.

Asimismo, para el estudio anatomopatológico fueron incluidos 10 pacientes sometidos a endarterectomía carotídea:

- *Grupo 1*: placa sintomática y ausencia de inflamación sistémica ([PCR-us] \leq 3 mg/L); (n=5).
- *Grupo 2*: placa sintomática e inflamación sistémica ([PCR-us] > 3 mg/L); (n=5).

Características epidemiológicas

En la muestra de estudio la media de edad fue de $70,5 \pm 3,8$ años; y la distribución por sexos fue de hombres el 100% (n=8).

En cuanto al diagnóstico, resultaron ictus isquémico el 50% (n=4) de los pacientes y de AIT el 50% (n=4) restante.

CARACTERÍSTICA	GRUPO 1	GRUPO 2	TOTAL
Edad	65,5	76,5	70,5
	N	N	
Sexo			
Hombre	4	4	100%
Mujer	0	0	0%
Antecedentes de HTA	1	2	37,5%
Antecedentes de DM	0	0	0%
Antecedentes de DL	3	1	50%
Antecedentes de alcoholismo	2	0	0%
Antecedentes de cardiopatía	1	1	25%
Clínica			
AIT	2	2	50%
Ictus	2	2	50%

Tabla 25. Descriptivo epidemiológico de la muestra.

Características bioquímicas

En la muestra estudiada los valores medios de PCR-us fueron de $1,3 \pm 0,3$ mg/L para el grupo 1, y de $17,6 \pm 5,7$ mg/L para el grupo 2.

GRUPO	[PCR-us] mg/L
1	$1,3 \pm 0,3$
2	$17,6 \pm 5,7$

Tabla 26. Descriptivo de [PCR-us] en la muestra.

En la muestra para el análisis anatomopatológico los valores medios de PCR-us fueron de $0,9 \pm 0,3$ mg/L para el grupo 1, y de $28,1 \pm 7,3$ mg/L para el grupo 2.

GRUPO	[PCR-us] mg/L
1	$0,9 \pm 0,3$
2	$28,1 \pm 7,3$

Tabla 27. Descriptivo de [PCR-us] en la muestra de anatomía patológica.

Análisis comparativo

Análisis del material recogido

Con el reclutamiento de pacientes finalizado se realizó un análisis del material capturado en los DPD.

Los análisis espectrofotométricos mediante Bradford demostraron la presencia de material biológico proteico capturado en los DPD durante el CAS.

La cantidad de proteína extraída del material recogido en los filtros fue mayor en el grupo 2; encontrando un valor medio de $407,2 \pm 58,5 \mu\text{g}$ frente a los $232,3 \pm 96,1 \mu\text{g}$ de media del grupo 1.

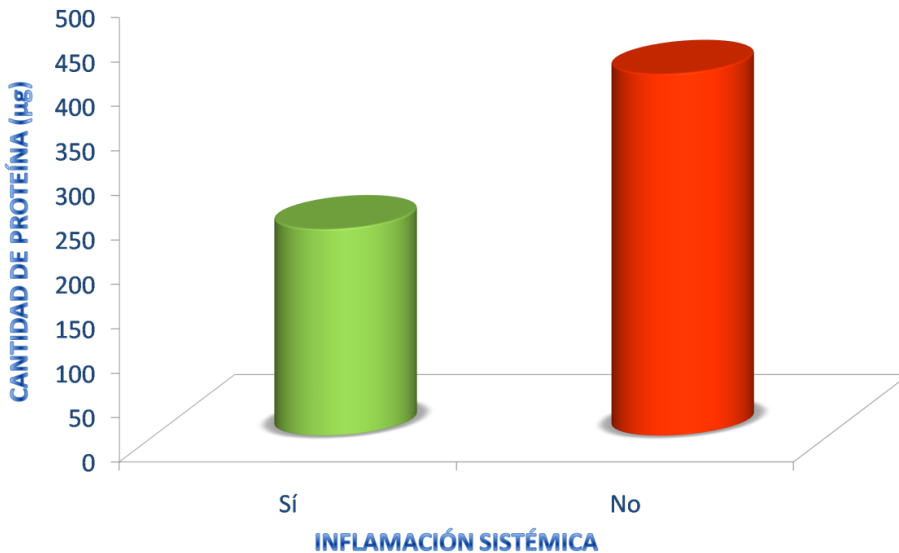


Ilustración 60. Cantidad media de proteína por grupo de estudio. Grupo 1, grupo 2.

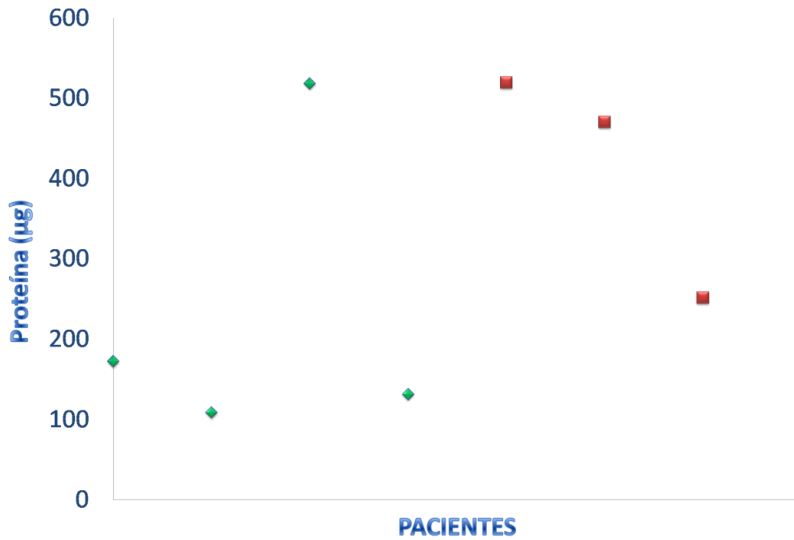


Ilustración 61. Cantidad de proteína por DPD. Pacientes del grupo 1, pacientes del grupo 2.

Electroforesis bidimensional

Patrones de expresión

El aislamiento de la fracción proteica del material capturado en los DPD permitió la aplicación de técnicas proteómicas.

Los análisis de 2DE permitieron comprobar que las proteínas extraídas del material recogido se separaban adecuadamente, resultando patrones de expresión proteica válidos para estudios de expresión.

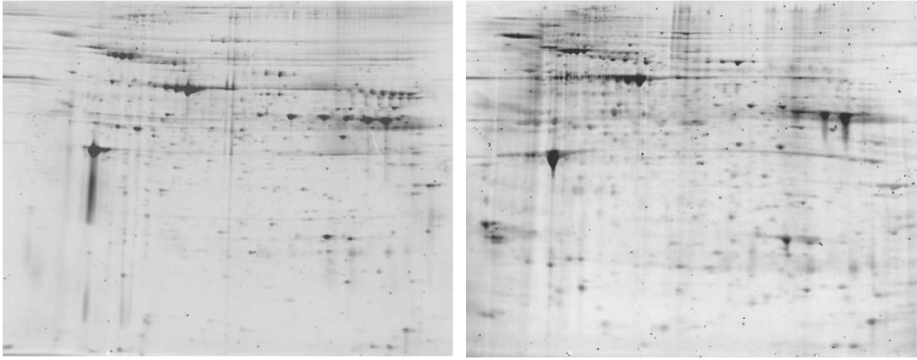


Ilustración 62. Geles característicos de 2DE del material capturado en DPD.

Estudio comparativo

La obtención de patrones de expresión proteica del material capturado en los filtros permitió realizar análisis comparativos de expresión proteica entre los diferentes grupos.

De este modo, se pudo realizar el análisis de los patrones de expresión proteica característicos para cada uno de los grupos de estudio:

- *Grupo 1*: placa sintomática y ausencia de inflamación sistémica ([PCR-us] \leq 3 mg/L); (n=4).
- *Grupo 2*: placa sintomática e inflamación sistémica ([PCR-us] $>$ 3 mg/L); (n=4).

Análisis de reproducibilidad

Los análisis visuales de los geles estudiados revelaron un grado de reproducibilidad elevado dentro de la misma muestra, tanto en número como en posición de los spots. Del mismo modo, el tamaño, forma e intensidad de los spots resultaron reproducibles.

Los análisis informáticos confirmaron una reproducibilidad elevada, en torno al 90 %.

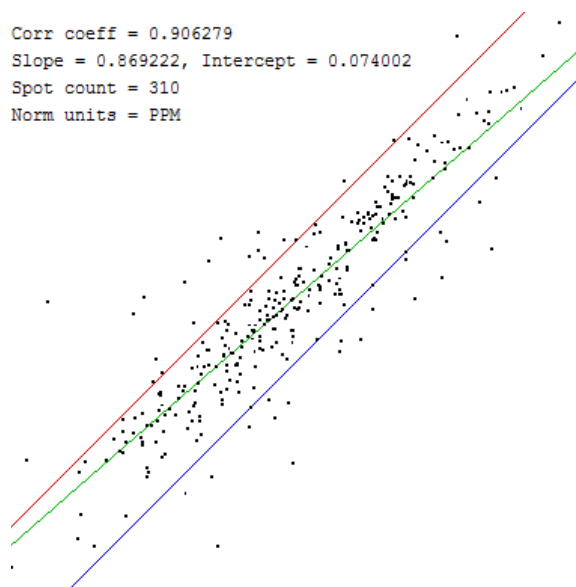


Ilustración 63. Análisis de reproducibilidad intraindividual.

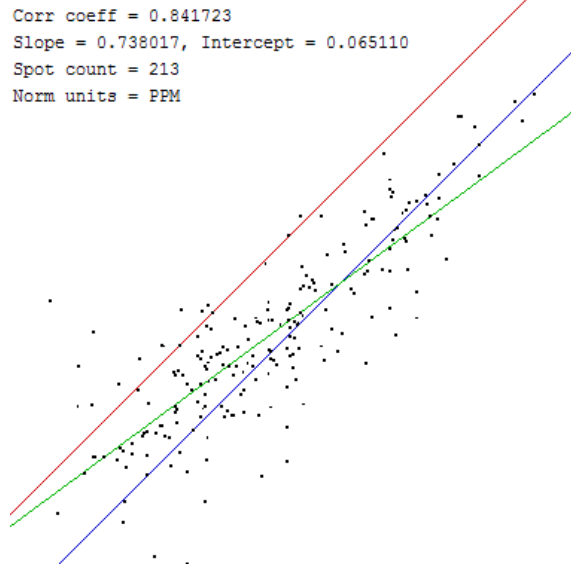


Ilustración 64. Análisis de reproducibilidad interindividual.

Análisis diferencial

El análisis de los geles una vez eliminados los spots dudosos, solapados y/o en zonas de difícil interpretación, reveló un patrón de expresión proteica del material recogido en los DPD de 370 spots detectados (gel máster).



Ilustración 65. Gel máster del material capturado en los DPD.

Análisis cualitativo

El análisis comparativo cualitativo de la expresión proteica, detectó 5 diferencias cualitativas en la expresión proteica del material de los filtros:

- 2 spots de expresión exclusiva en el grupo 1.
- 3 spots de expresión exclusiva en el grupo 2.

GRUPO	SPOT
1	8510 9109
2	329 1023 5319

Tabla 28. Diferencias cualitativas encontradas.

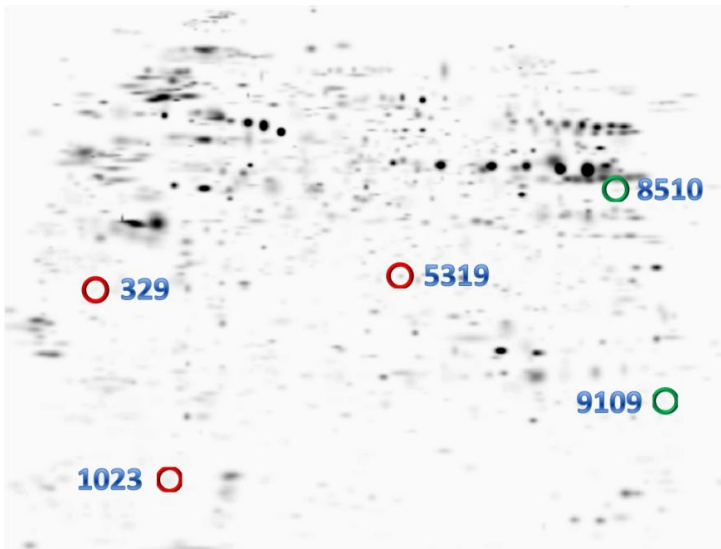


Ilustración 66. Gel de 2DE con las diferencias cualitativas encontradas.

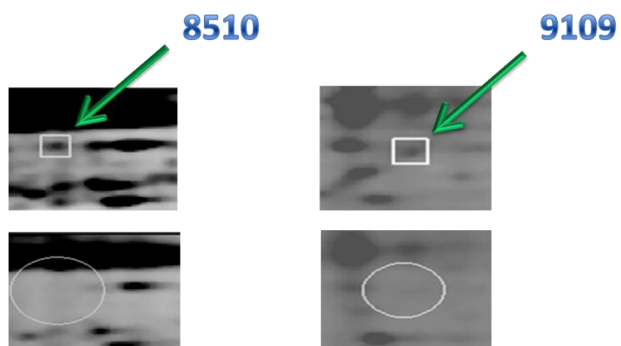


Ilustración 67. Representación de las diferencias cualitativas encontradas en el grupo 1.

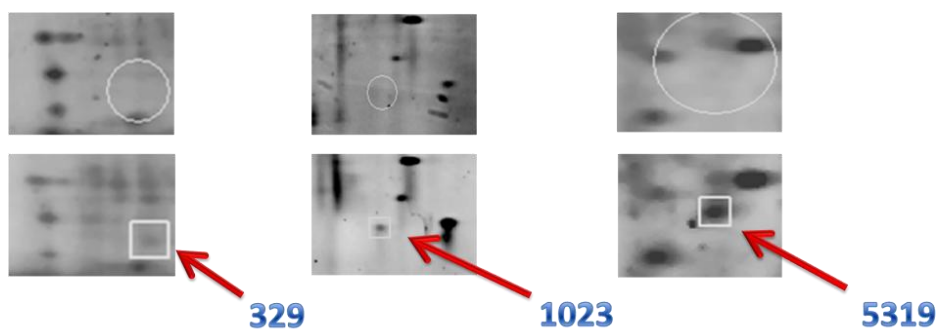


Ilustración 68. Representación de las diferencias cualitativas encontradas en el grupo 2.

Análisis cuantitativo

El análisis comparativo cuantitativo detectó 2 diferencias cuantitativas en la expresión proteica del material de los DPD:

- 2 spots están sobreexpresados en el grupo 2.

GRUPO	SPOT
2	2003
	4209

Tabla 29. Diferencias cuantitativas encontradas.

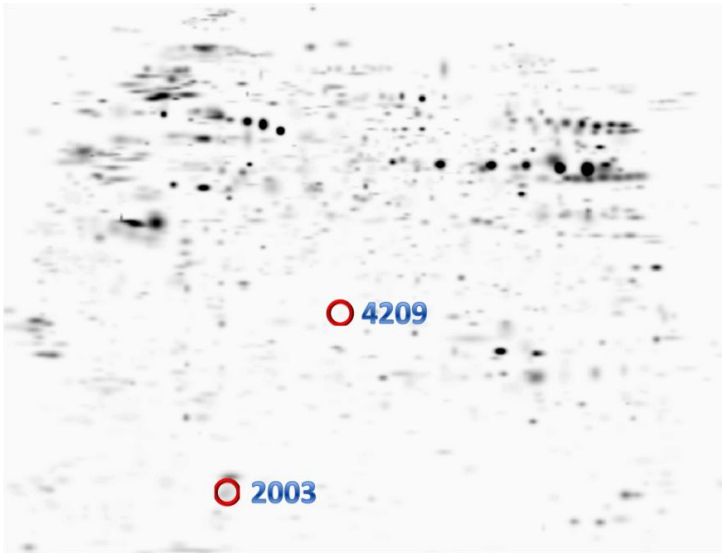


Ilustración 69. Gel de 2DE con las diferencias cuantitativas encontradas.

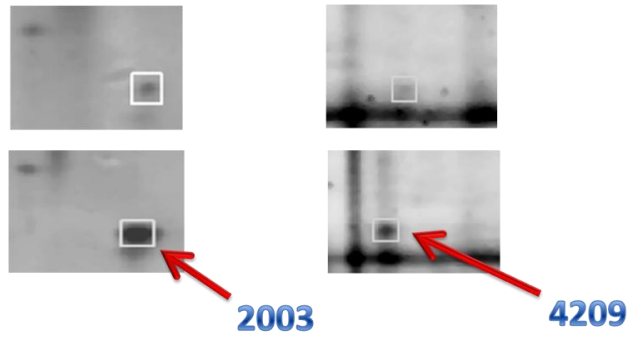


Ilustración 70. Representación de las diferencias cuantitativas encontradas.

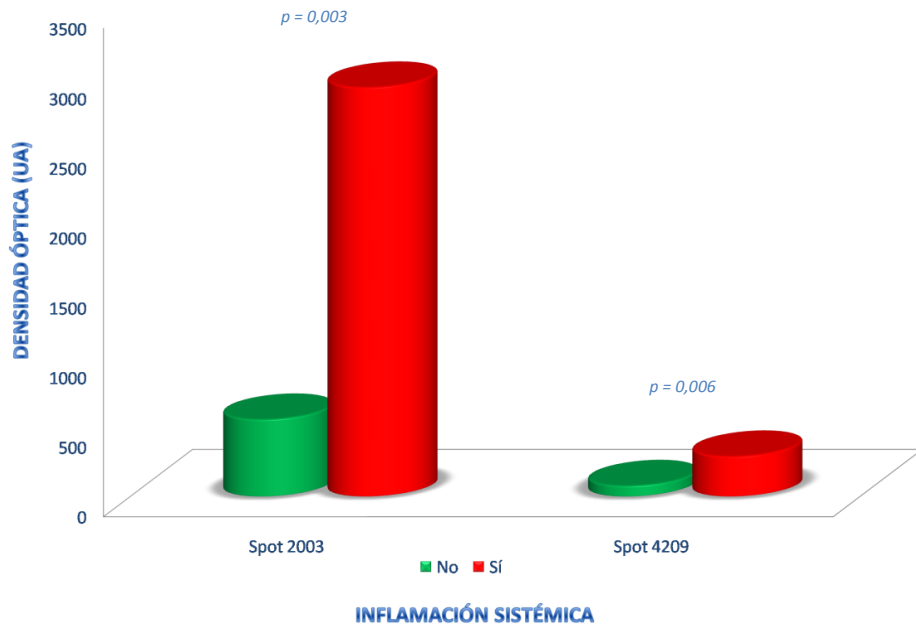


Ilustración 71. Representación gráfica de las diferencias cuantitativas encontradas.

Espectrometría de masas

Una vez detectados los spots diferencialmente expresados se procedió a su identificación por espectrometría de masas.

Diferencias cualitativas

Los análisis por MS identificaron los 5 spots con expresión exclusiva.

SPOT	PROTEÍNA
8510	Proteasome subunit 8 beta type
9109	Glutathione S transferase kappa 1

Tabla 30. Diferencias cualitativas identificadas del grupo 1.

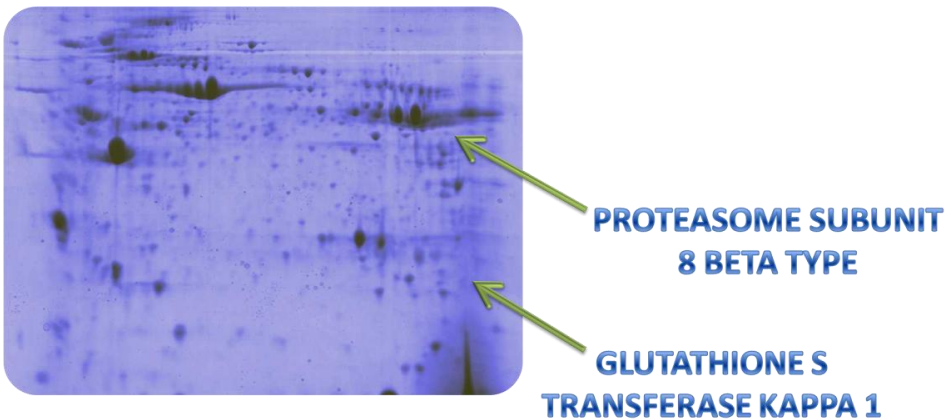


Ilustración 72. Gel 2DE con las diferencias cualitativas identificadas del grupo 1.

SPOT	PROTEÍNA
329	Annexin A5
1023	Haptoglobin precursor
5319	Purine nucleoside phosphorilase

Tabla 31. Diferencias cualitativas identificadas del grupo 2.

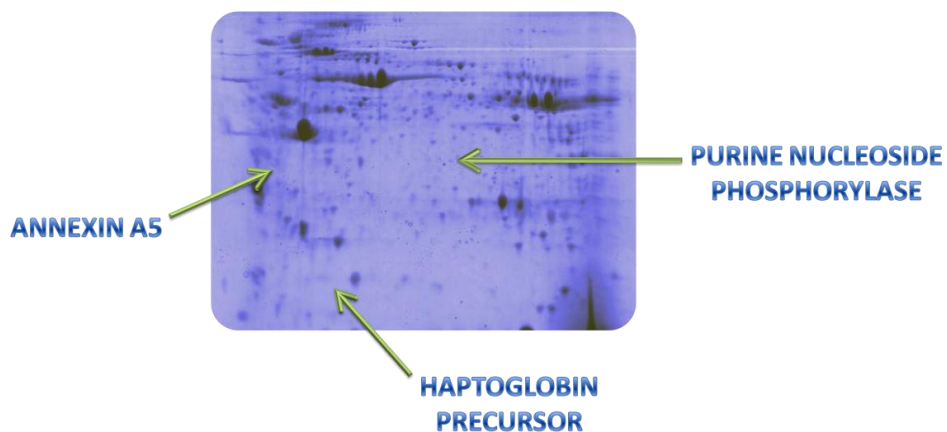


Ilustración 73. Gel 2DE con las diferencias cualitativas identificadas del grupo 2.

Diferencias cuantitativas

Los análisis por MS permitieron la identificación de los 2 spots sobreexpresados en el grupo 2.

SPOT	PROTEÍNA
2003	Transgelin-2
4209	Bisphosphoglycerate mutase

Tabla 32. Diferencias cuantitativas identificadas.

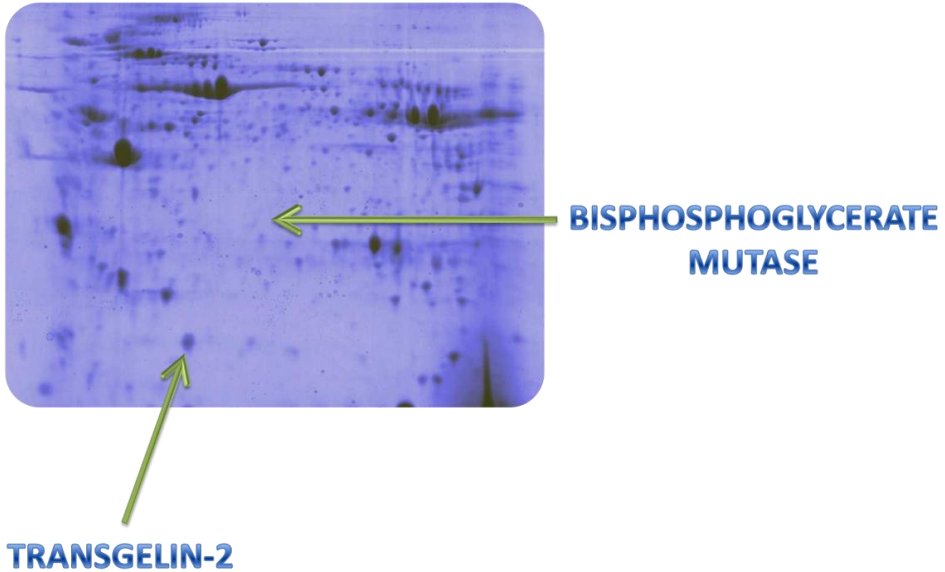


Ilustración 74. Gel 2DE con las diferencias cuantitativas identificadas.

Anatomía patológica

Histología

Placas de ateroma

Los análisis histológicos de las placas de ateroma mostraron lesiones muy avanzadas y complicadas de tipo V (en 3 casos del grupo 1 y en 1 caso del grupo 2) y VI (en 2 casos del grupo 1 y en 4 casos del grupo 2) [193]; que presentaban grandes áreas de ruptura, así como hemorragias intraplaca.

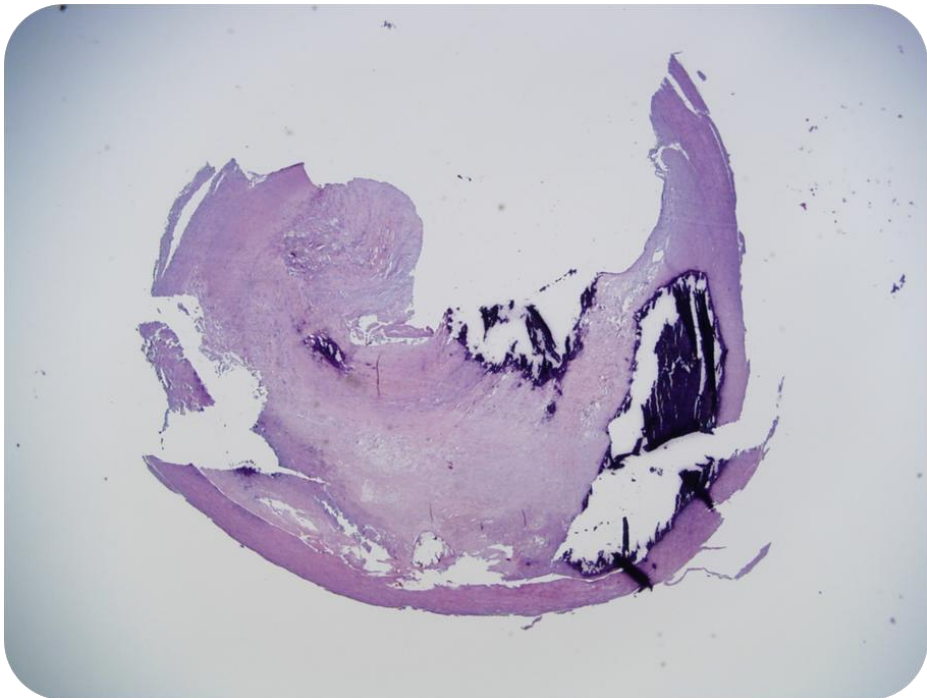


Ilustración 75. Histología general de la placa de ateroma (2X).

En general, eran lesiones con poca celularidad, siendo abundante la presencia de grandes calcificaciones; así como fenómenos de fibrosis y necrosis.

También se observaron extensas áreas de acumulación de macrófagos, células espumosas y cristales de colesterol.

CALCIFICACIÓN

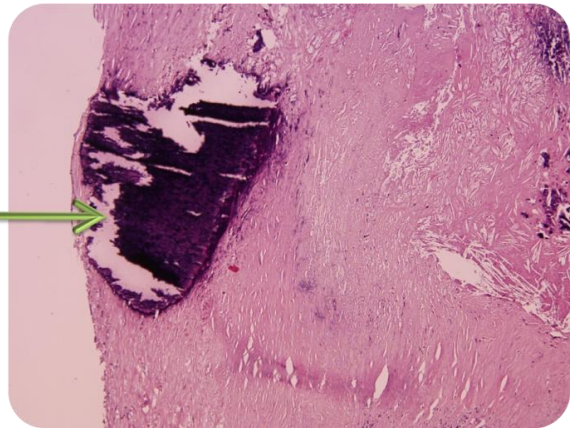


Ilustración 76. Histología: calcificación (10X).

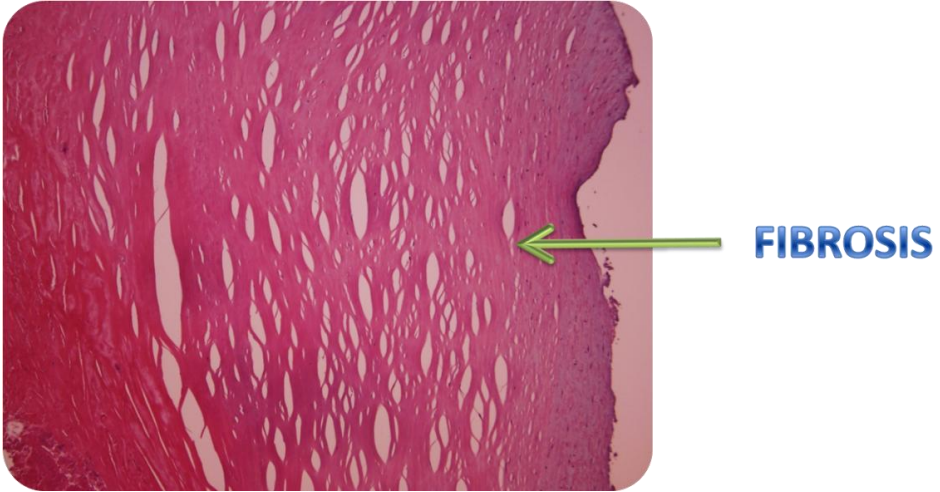


Ilustración 77. Histología: fibrosis (10X).

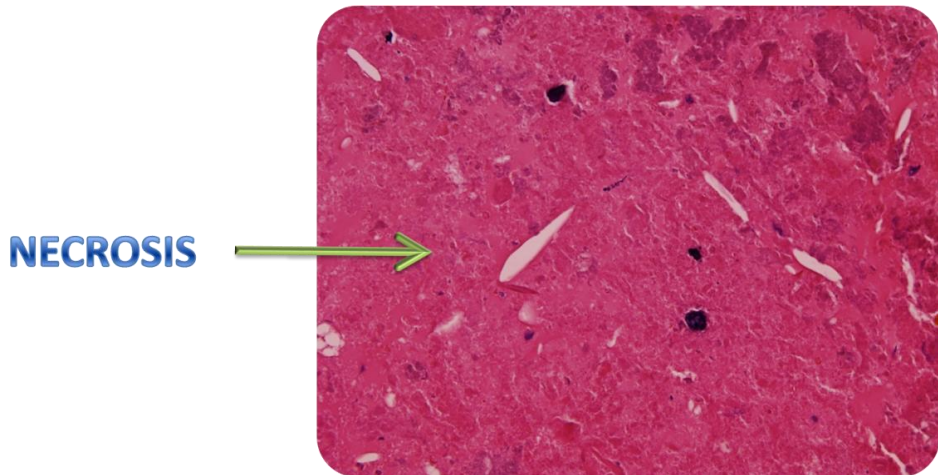


Ilustración 78. Histología: necrosis (40X).

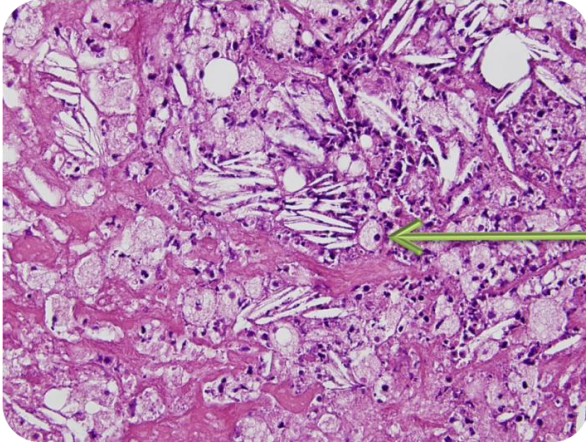
**MACRÓFAGOS**

Ilustración 79. Histología: macrófagos (40X).

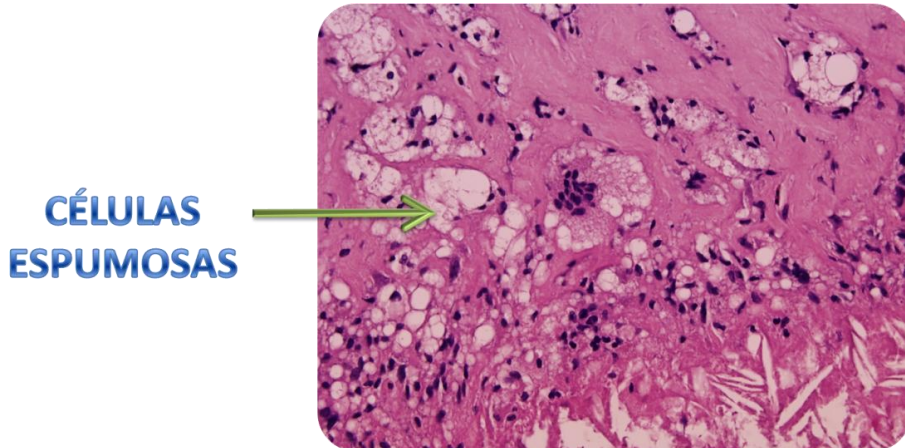
**CÉLULAS
ESPUMOSAS**

Ilustración 80. Histología: células espumosas (40X).

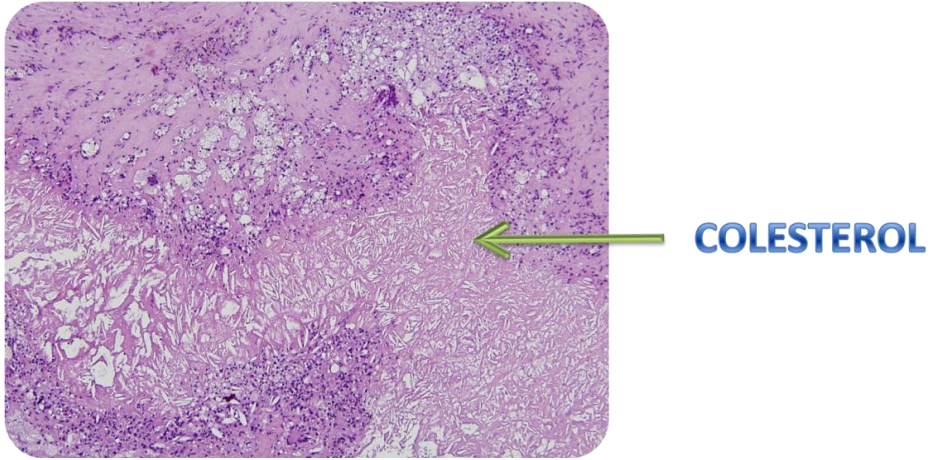


Ilustración 81. Histología: cristales de colesterol (10X).

DPD

El análisis histológico de las membranas de los DPD permitió caracterizar el material capturado.

Se observaron restos de la placa de ateroma adheridos a la membrana; así como restos de material trombótico.

Las características de este material fueron similares a las descritas para las placas de ateroma.

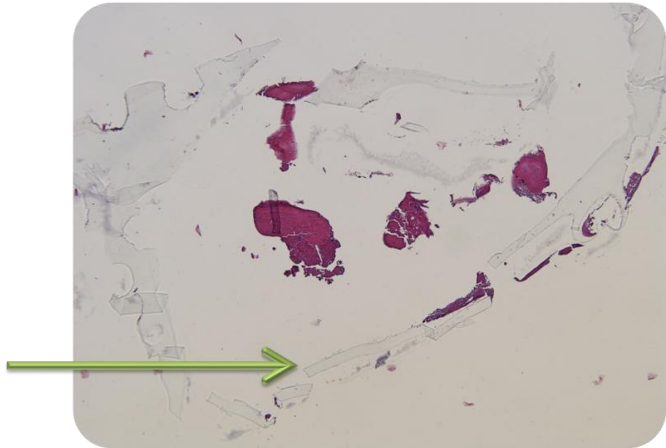
MEMBRANA

Ilustración 82. Histología: restos biológicos adheridos a la membrana de DPD (4X).

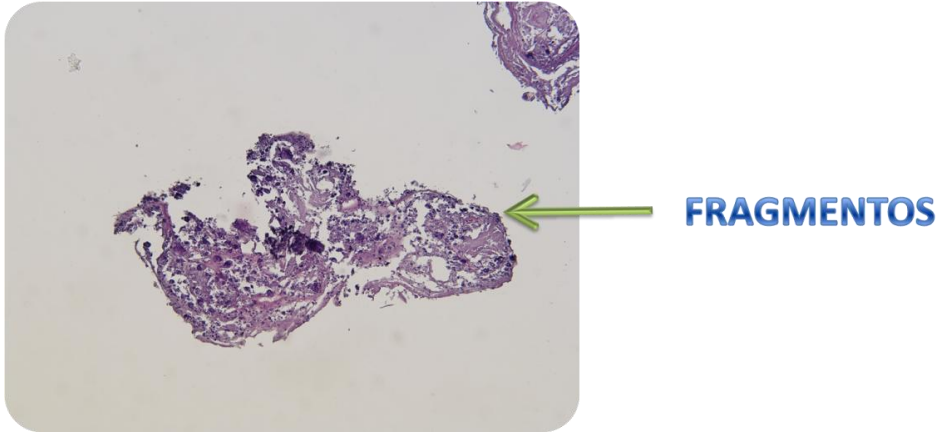


Ilustración 83. Histología: fragmentos de placa de ateroma capturados en DPD (20X).

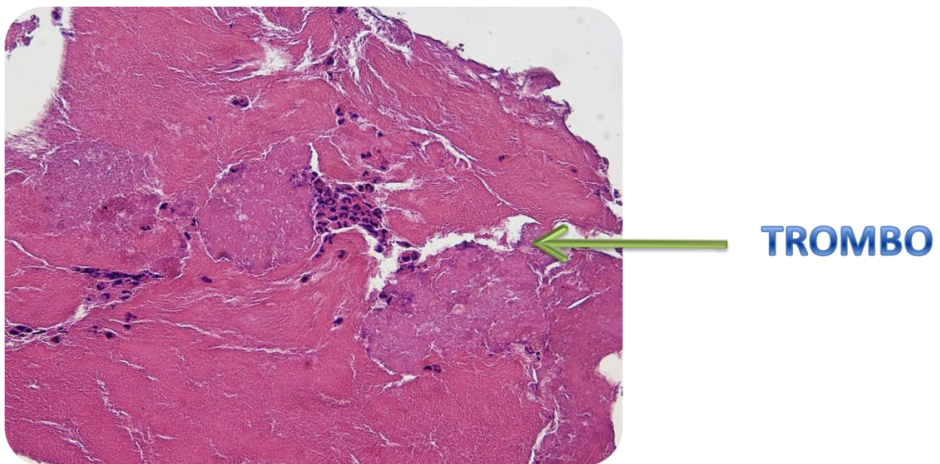


Ilustración 84. Histología: restos de trombo capturado en DPD (40X).

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica permitió validar los resultados encontrados por proteómica de expresión del material capturado en los DPD, y establecer patrones de expresión de las proteínas estudiadas en la placa de ateroma.

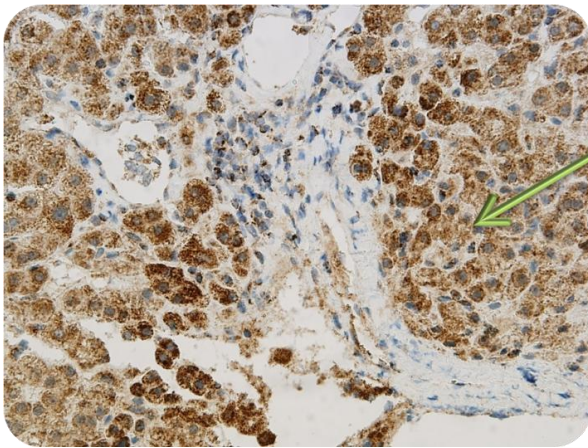
Los análisis inmunohistoquímicos se centraron en la tinción de 4 de las proteínas identificadas:

PROTEÍNA	DIFERENCIA	GRUPO
GSTK1	Cualitativa	1
ANXA5	Cualitativa	2
NP	Cualitativa	2
TAGLN2	Cuantitativa	2

Tabla 33. Proteínas estudiadas por inmunohistoquímica.

GSTK1

La tinción Inmunohistoquímica frente a GSTK1 en el control positivo, reveló inmunoreactividad para los hepatocitos en hígado sano; en el citoplasma, dando aspecto granular por tinción de los peroxisomas.



HEPATOCITOS

Ilustración 85. Inmunohistoquímica: control positivo para GSTK1 (40X).

En las placas de ateroma, la tinción frente a GSTK1 reveló una inmunoreactividad selectiva positiva de fibroblastos y macrófagos; en el citoplasma.

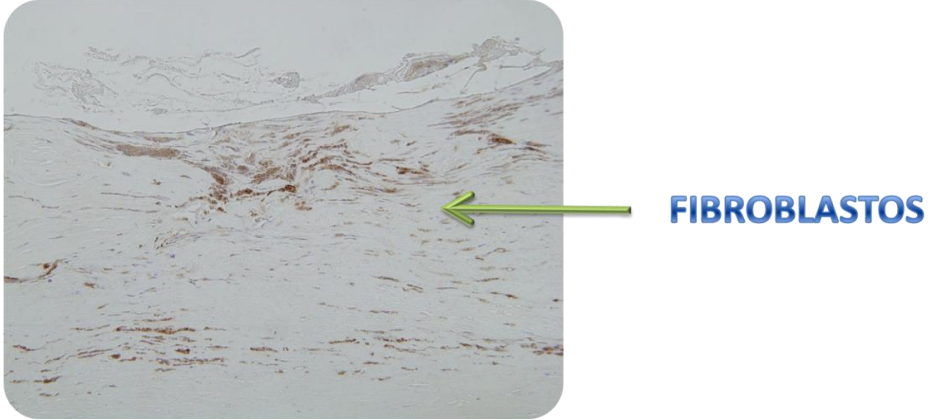


Ilustración 86.. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con fibroblastos teñidos para GSTK1 (20X).

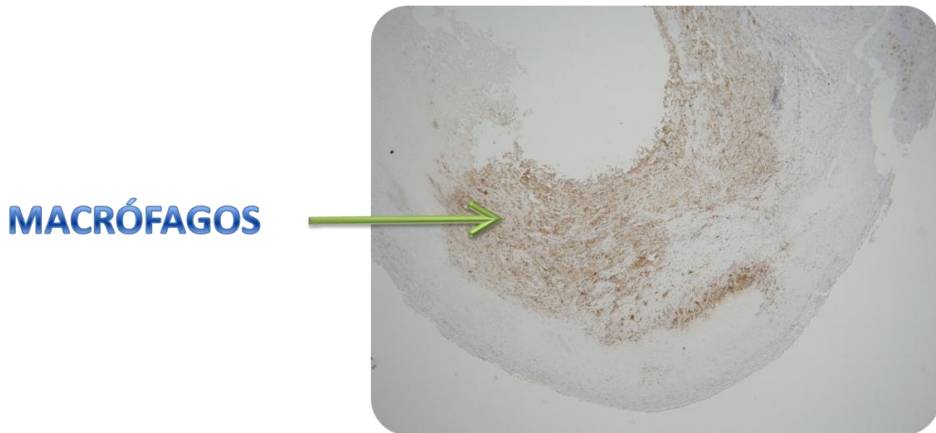


Ilustración 87. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con macrófagos teñidos para GSTK1 (4X).

La inmunoexpresión frente a GSTK1 resultó negativa para 5 de los casos estudiados. Los casos restantes presentaron reactividad positiva difusa en ambos grupos: 3 casos del grupo 2 y 2 casos del grupo 1; no siendo concluyentes las diferencias encontradas en la expresión.

GRUPO		NEGATIVA	POSITIVA HETEROGÉNEA	POSITIVA DIFUSA
1	Recuento	3	0	2
	<i>% de grupo</i>	60%	0%	40%
2	Recuento	2	0	3
	<i>% de grupo</i>	40%	0%	60%

Tabla 34. Tabla de contingencia de inmunoexpresión para GSTK1.

ANXA5

La tinción inmunohistoquímica frente a ANXA5 en el control positivo, reveló inmunoreactividad para los macrófagos alveolares en carcinoma de pulmón; tanto en el citoplasma como en la membrana.

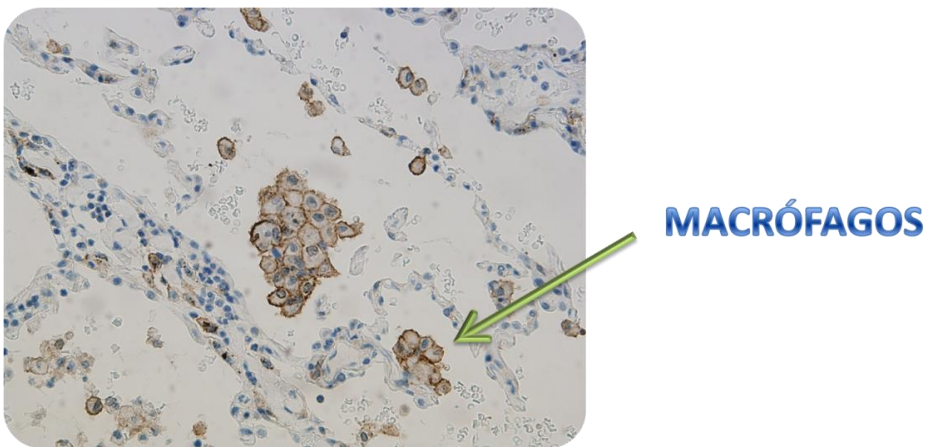


Ilustración 88. Inmunohistoquímica: control positivo para ANXA5 (40X)

En las placas de ateroma estudiadas, la tinción inmunohistoquímica frente a ANXA5 reveló inmunoreactividad positiva selectiva de macrófagos y fibroblastos; tanto en la membrana celular como en el citoplasma. Al mismo tiempo, se observó inmunoreactividad positiva del endotelio vascular.

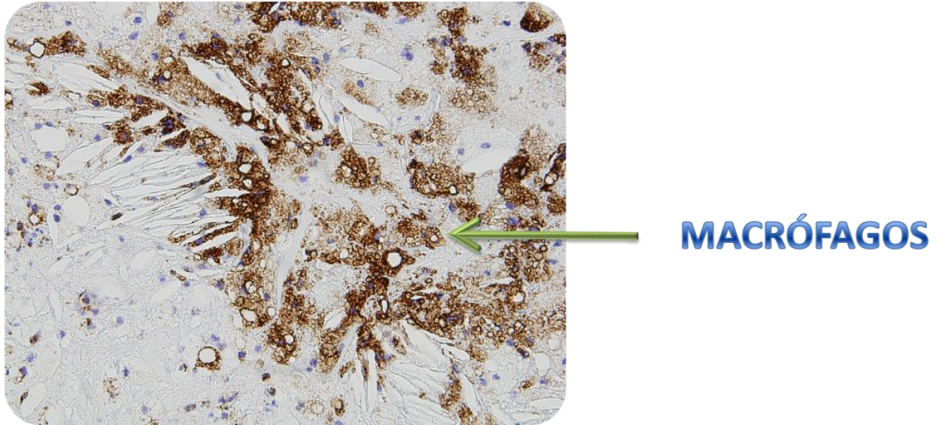


Ilustración 89. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con macrófagos teñidos para ANXA5 (40X).

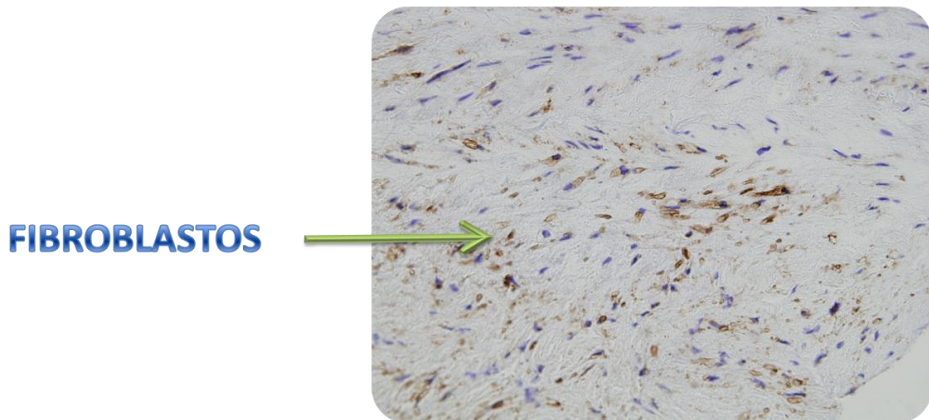


Ilustración 90. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con fibroblastos teñidos para ANXA5 (40X).

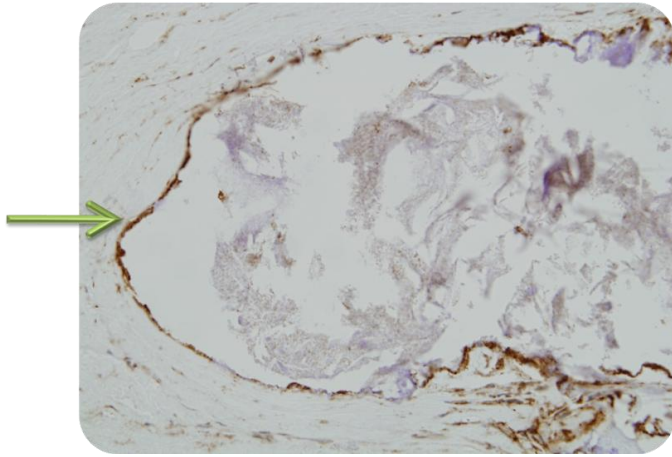
ENDOTELIO

Ilustración 91. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con endotelio teñido para ANXA5 (20X).

La reactividad frente a ANXA5 no quedó restringida a macrófagos y fibroblastos del grupo 2, sino que fueron positivos para todos los casos estudiados. El porcentaje de células inmunopositivas resultó mayor en las placas de ateroma pertenecientes al grupo 2, presentando expresión difusa los 5 casos; siendo estadísticamente significativa ($p= 0,01$) esta diferencia respecto al grupo 1.

GRUPO		NEGATIVA	POSITIVA HETEROGÉNEA	POSITIVA DIFUSA
1	Recuento	0	4	1
	% de grupo	0%	80%	20%
2	Recuento	0	0	5
	% de grupo	0%	0%	100%

Tabla 35. Tabla de contingencia de inmunoexpresión para ANXA5.

NP

La tinción Inmunohistoquímica frente a NP en el control positivo, reveló inmunoreactividad para los linfocitos en amígdala normal; tanto en el citoplasma como en el núcleo.

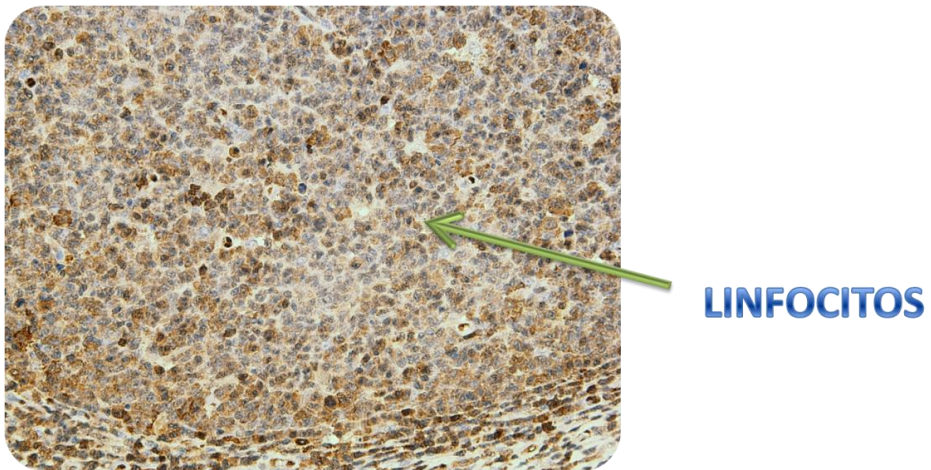


Ilustración 92. Inmunohistoquímica: control positivo para NP (40X).

En las placas de ateroma, la tinción frente a NP de purinas reveló una inmunoreactividad positiva selectiva en citoplasma y en el núcleo de macrófagos; así como en el de algunos fibroblastos.

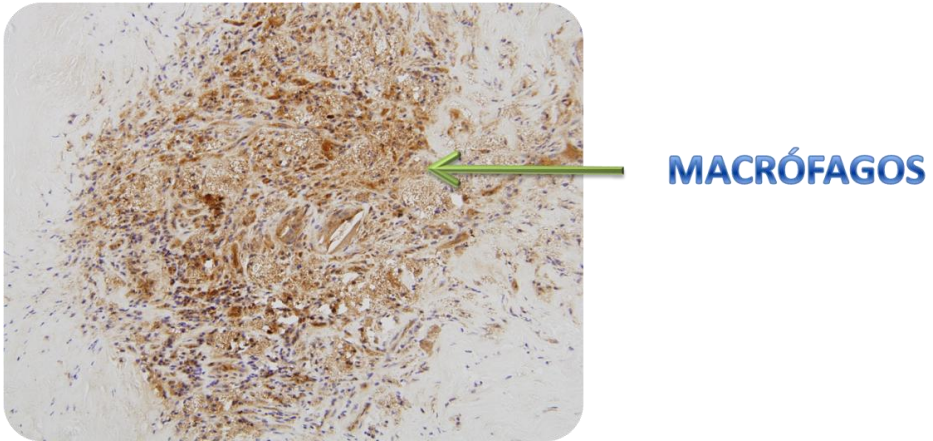


Ilustración 93. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con macrófagos teñidos para NP (20X).

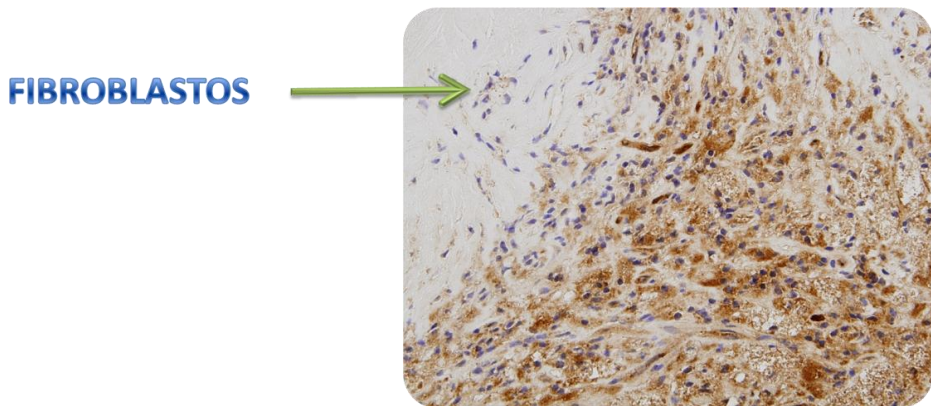


Ilustración 94. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con fibroblastos teñidos para NP (40X).

La inmunexpresión resultó negativa en 6 de los casos estudiados. En los 4 casos restantes se pudo observar una reactividad positiva en ambos grupos, aunque de diferente grado: 2 presentaron reactividad positiva heterogénea (grupo 1) y 2 difusa (grupo 2); no encontrando estadísticamente diferencias entre los grupos.

GRUPO		NEGATIVA	POSITIVA HETEROGÉNEA	POSITIVA DIFUSA
1	Recuento	3	2	0
	<i>% de grupo</i>	60%	40%	0%
2	Recuento	3	0	2
	<i>% de grupo</i>	60%	0%	40%

Tabla 36. Tabla de contingencia de inmunexpresión para NP.

TAGLN2

La tinción Inmunohistoquímica frente a TAGLN2 en el control positivo, reveló inmunoreactividad para los fibroblastos en carcinoma de colon; en la membrana apical.

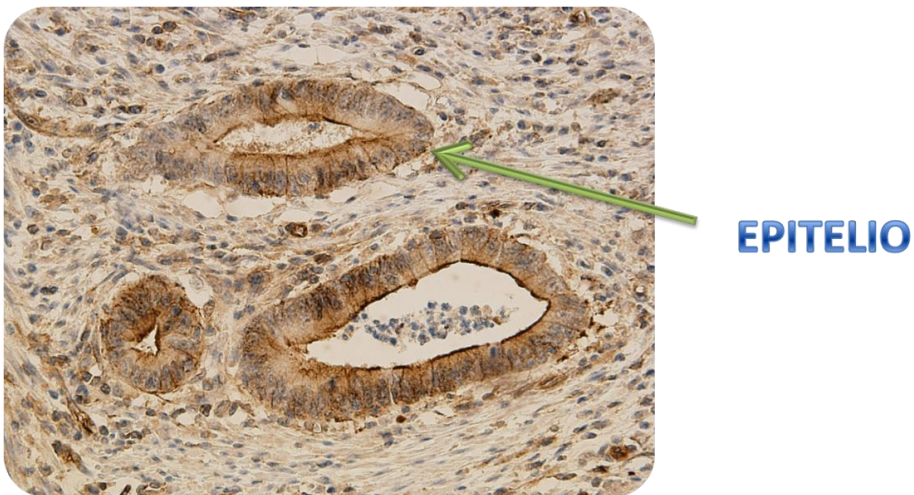


Ilustración 95. Inmunohistoquímica: control positivo para TAGLN2 (40X).

En las placas de ateroma estudiadas, la tinción frente a TAGLN2 reveló una inmunoreactividad selectiva positiva en fibroblastos que diferencian a CML, en la membrana y en el citoplasma. Igualmente se observaron acúmulos de macrófagos inmunoreactivos frente a esta proteína.

FIBROBLASTOS

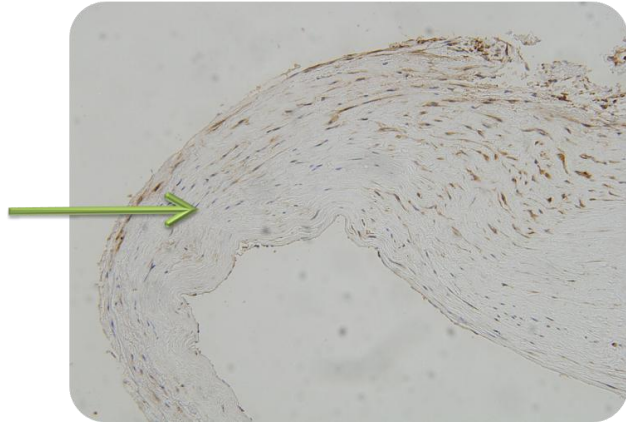
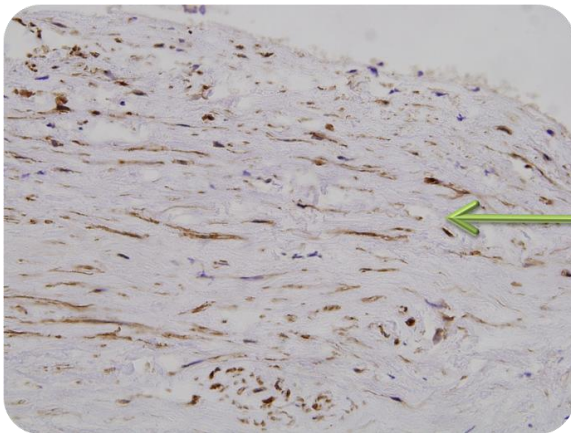


Ilustración 96. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con fibroblastos teñidos para TAGLN2 (20X).



MACRÓFAGOS

Ilustración 97. Inmunohistoquímica: placa de ateroma con macrófagos teñidos para TAGLN2 (40X).

El porcentaje de células inmunopositivas resultó mayor en los casos del grupo 2, aunque no fue estadísticamente significativo, dado que la inmunoreactividad resultó negativa en 4 de los casos estudiados.

GRUPO		NEGATIVA	POSITIVA HETEROGÉNEA	POSITIVA DIFUSA
1	Recuento	2	3	0
	<i>% de grupo</i>	40%	60%	0%
2	Recuento	2	1	2
	<i>% de grupo</i>	40%	20%	40%

Tabla 37. Tabla de contingencia de inmunoexpresión para TAGLN2.

DISCUSIÓN

Dificultades en el estudio de la aterosclerosis

A pesar de los avances en el manejo de los factores de riesgo de la aterosclerosis, no es posible discriminar aquellos sujetos con una elevada probabilidad de desarrollar episodios cardio o cerebrovasculares [334], convirtiendo a la aterosclerosis en la principal causa de mortalidad en el mundo occidental. Para poder realizar tratamientos preventivos de las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, es fundamental definir biomarcadores con valor pronóstico y diagnóstico, que supongan un valor añadido a los factores de riesgo ya conocidos.

Las complicaciones clínicas agudas de la aterosclerosis son consecuencia de la ruptura de la placa aterosclerótica que lleva a la exposición de componentes trombogénicos hacia el torrente sanguíneo con la consiguiente formación del trombo [335], pudiendo ocluir totalmente el lumen o causar una embolización distal [336]. La definición de placa de ateroma vulnerable o propensa a la ruptura continúa, hoy en día, estando descrita por características histopatológicas (núcleo lipídico amplio, presencia de células inflamatorias y escasez de células de músculo liso y de tejido fibroso) [83, 120, 193].

Las técnicas de imagen que permiten la visualización de características estructurales y morfológicas de la placa aterosclerótica pueden ser útiles para identificar, in vivo, las características de la placa vulnerable; aunque de forma teórica, puesto que actualmente se carece de evidencias prospectivas

respecto al valor de estas características de la placa vulnerable como predictoras de episodios clínicos. Al mismo tiempo, existe cierta controversia en cuanto que las placas inflamatorias ricas en lípidos se observan con frecuencia en pacientes asintomáticos [337], las placas que carecen de las típicas características histopatológicas son capaces de causar episodios clínicos [338] y que la ruptura en sí, es a menudo asintomática [339].

Para el estudio predictivo de episodios cerebrovasculares, también es necesario considerar factores de riesgo sistémicos, conjuntamente con las características locales de la placa; hablando, por tanto, del paciente vulnerable (paciente en el que la ruptura de una placa vulnerable es probable que resulte en un episodio clínico) [340], más que de la placa vulnerable. De este modo, las posibles estrategias deberían ir encaminadas a la caracterización de este paciente vulnerable para poder prevenir episodios clínicos, es decir, buscar biomarcadores definitorios de este estado. Dado que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica, tanto proteínas inflamatorias conocidas como proteínas de fase aguda han sido estudiadas para identificar lesiones ateroscleróticas; siendo la PCR el biomarcador sérico más estudiado. Aunque tiene un valor predictivo independiente de episodios cardiovasculares [341], y el tratamiento con estatinas produce un descenso de los niveles de PCR-us [342], el valor como biomarcador es moderado, siendo inferior al de los factores de riesgo tradicionales.

Otra aproximación en la búsqueda de nuevos biomarcadores, es estudiar moléculas que están presentes en placas inestables o que están envueltas en los mecanismos de desestabilización. De esta forma, la presencia a nivel

sistémico de niveles elevados de marcadores derivados de la placa, podrían representar una presencia de placas inestables y por tanto identificarían al paciente vulnerable [204].

Nueva aproximación

Existen evidencias de que los procesos que causan la desestabilización de la placa pueden no estar limitados a una sola placa culpable, sino que pueden ser generalizados; de forma que, estas placas inestables estén presentes de forma difusa a lo largo del árbol vascular. Entonces, cabe la posibilidad de buscar características locales de la placa que puedan predecir episodios cerebrovasculares sistémicos, es decir, buscar biomarcadores locales de progresión sistémica. Teóricamente, los mediadores inflamatorios u otros marcadores de inestabilidad medidos en un territorio del árbol vascular podrían proporcionar información del grado de estabilidad de todo el sistema aterosclerótico arterial; sirviendo, por tanto, el tejido aterosclerótico local obtenido en intervenciones revascularizadoras para encontrar marcadores asociados con la vulnerabilidad de la placa generalizada en todo el árbol vascular [204].

El tratamiento secundario del ictus isquémico de origen aterotrombótico está dirigido a la eliminación de la estenosis carotídea para la prevención de nuevos episodios embólicos. En este sentido, la ATP/CAS se ha convertido en los últimos años en una alternativa a la CEA. El empleo de DPD en estas intervenciones sirve para capturar el material liberado durante la interven-

ción que podría causar embolizaciones distales. Pero además, la posibilidad de la recuperación de estos dispositivos una vez finalizada la intervención, permite disponer de estos restos capturados que pueden estar reflejando las diferencias vistas en las placas ateromatosas encontradas en los pacientes.

Esta estrategia, en principio, más adecuada en la búsqueda de biomarcadores de paciente vulnerable con el fin de desarrollar estrategias dirigidas a la reducción de episodios neurológicos, se desarrolla en este estudio de proteómica de expresión; analizando los detritus desprendidos durante la ATP para un mayor conocimiento de la placa aterosclerótica (perspectiva local), pero agrupando a los pacientes en función de su estado inflamatorio, valorado a través de niveles séricos de PCR-us (perspectiva sistémica). De esta forma, siguiendo la definición de paciente vulnerable, se estudian los 2 componentes principales: placa vulnerable y sangre vulnerable [123, 340]. Asimismo, este estudio aprovecha el avance de la tecnología que permite el estudio de gran número de genes y proteínas simultáneamente; aproximaciones muy útiles para la identificación de marcadores de aterosclerosis [343].

Estudio del material capturado en los DPD

El estudio del material capturado en los DPD realizado hasta el momento, ha sido de carácter histopatológico; caracterizando el tamaño, morfología y composición de los elementos capturados. Así, se ha podido caracterizar el tamaño de estos restos, entre 1 μm y 5000 μm ; dimensiones considerables teniendo en cuenta los diámetros de la microcirculación arterial ($< 300 \mu\text{m}$), de las pequeñas arterias (300 -100 μm), de las arteriolas (100-12 μm) y de los capilares ($< 12 \mu\text{m}$) [344]. La caracterización morfológica y de composición de los restos capturados ha confirmado que son componentes de la placa de ateroma; observando cristales de colesterol, masas lipídicas, células espumosas y material trombótico [345]. Al mismo tiempo, estos estudios han mostrado diferencias entre pacientes en el material recogido en los dispositivos de protección distal, debidas en parte a la placa carotídea [346].

El análisis histopatológico de las membranas de los DPD en este estudio, también demostró la presencia de material biológico capturado, procedente de la placa de ateroma. Fue posible observar fragmentos de placa de ateroma liberados durante el CAS; así como trombos procedentes de la superficie luminal de la placa. Estos hallazgos confirman que durante la ATP/CAS se liberan fragmentos de la placa de ateroma y que los DPD son efectivos en la captura de este material impidiendo la embolización distal.

El análisis del material capturado en los DPD también ha permitido determinar la validez del mismo para técnicas de 2DE. Ha sido posible extraer proteínas de estos restos, y se han podido cuantificar. Esta cuantificación proteica permitió observar una mayor concentración de proteínas en el material procedente de placas de ateroma en condiciones de inflamación sistémica. Estas diferencias en el material capturado parecen estar relacionadas con la distinta actividad local de las placas de ateroma derivada de la influencia del ambiente inflamatorio sistémico, que actuaría magnificando los fenómenos de ruptura y trombosis; de forma similar a las diferencias en las placas de ateroma encontradas en otros estudios [346].

Igualmente, el estudio de proteómica por 2DE permitió comprobar que es posible determinar el perfil de expresión proteica del material recogido en los DPD; infiriendo de este modo el perfil de expresión proteica de las placas de ateroma de las que proceden. Se caracterizó el patrón de expresión proteica de las placas de ateroma sintomáticas, obteniendo cerca de 400 spots que representan las proteínas presentes en las muestras. Este patrón extenso también está en concordancia con los mecanismos activos que se están produciendo en estas lesiones avanzadas.

El estudio comparativo reveló diferencias en la expresión proteica comparando placas de ateroma en ambiente inflamatorio sistémico y en ausencia del mismo; identificando 5 diferencias cualitativas (3 proteínas de expresión exclusiva en lesiones en ambiente inflamatorio -ANXA5, NP, HP- y 2 en lesiones en ambiente sin inflamación sistémica -GSTK1, PSMB8-) y 2 diferen-

cias cuantitativas (sobreexpresadas en un ambiente inflamatorio –TAGLN2, BPGM-).

En los últimos años las técnicas proteómicas han sido aplicadas para el estudio de la aterosclerosis, con el fin de ver marcadores de progresión o complicación de las placas de ateroma [347, 348]. Es posible encontrar aproximaciones a la enfermedad mediante modelos animales [349]; aunque la falta de modelos animales grandes con enfermedad aterosclerótica espontánea, que imiten a la aterosclerosis avanzada en humanos [350] y la progresión de la enfermedad en décadas, hace que estos estudios no sean representativos; siendo la aplicación de los hallazgos en modelos animales a la práctica clínica diaria complicada. Otras aproximaciones están basadas en el estudio del material obtenido por endarterectomía para la búsqueda de marcadores locales de placa de ateroma complicada [351] o de progresión de la placa de ateroma [328]. Sin embargo, estas aproximaciones no mantienen un correlato con la clínica, ni en el material de estudio ni en los resultados; centrándose exclusivamente en el estudio de mecanismos locales.

La búsqueda de biomarcadores en la aterosclerosis debe ir dirigida a la identificación de los procesos responsables de la complicación de las lesiones para prevenir episodios clínicos; pero para esto es necesario concebir la aterosclerosis como lo que es: una enfermedad sistémica. En este sentido, los estudios realizados hasta el momento sólo consideraron los cambios locales en la placa de ateroma. Es necesaria una clasificación de los pacientes en función de marcadores sistémicos como puede ser la PCR-us, que indica el grado de inflamación (que juega un papel importante en el inicio,

progresión y complicación de las lesiones ateroscleróticas); de modo que, se conjuga el estudio de los cambios a locales que se producen en la placa de ateroma a través del material capturado en los DPD con las características sistémicas del paciente. Así, la identificación de estos biomarcadores locales podría ayudar a predecir episodios cerebrovasculares sistémicos.

Estudio de las proteínas identificadas

La tinción inmunohistoquímica frente a las proteínas identificadas en este estudio, ha permitido observar los patrones de expresión de las mismas, es decir, qué célula y dónde se expresan; lo que permite situarlas en un contexto fisiopatológico.

Cabe resaltar el hecho de que las proteínas identificadas en el análisis de proteómica de expresión como diferencias cualitativas, es decir, de expresión exclusiva en uno de los grupos, en el análisis inmunohistoquímico apareciesen como diferencias cuantitativas. La inmunotinción, que emplea anticuerpos específicos frente a la proteína de interés, es un método más específico y sensible que la proteómica de expresión; de modo que es probable que aparezcan estas variaciones. Asimismo, el estudio de proteómica de expresión fue realizado sobre restos de la placa de ateroma y el estudio inmunohistoquímico sobre placas de ateroma enteras; de forma que, las variaciones encontradas entre ambas técnicas puedan ser debidas al tipo de muestras empleadas. Los restos capturados en los DPDs durante el CAS pertenecen a la parte más complicada, inestable y, por tanto, activa de la placa

de ateroma; siendo esta zona además la más expuesta al ambiente sistémico. Por el contrario, en la endarterectomía se obtiene toda la placa de ateroma, en la cual se encuentran las diferentes partes de la lesión, contando también con zonas menos expuestas; lo que puede estar alterando la expresión detectada.

A pesar de todo, este hecho no resta valor al estudio, puesto que el objetivo de las técnicas inmunohistoquímicas era confirmar los hallazgos encontrados por técnicas proteómicas y establecer unos patrones de expresión para un mejor conocimiento de los procesos subyacentes a la inestabilidad de la placa de ateroma.

ANXA5

Las anexinas son proteínas conservadas evolutivamente, que se encuentran ampliamente expresadas en diversos tejidos humanos; representando hasta el 2% del total de proteínas intracelulares en los eucariotas [352]. Son proteínas de unión al Ca^{++} y a fosfolípidos que interaccionan con las membranas celulares.

La ANXA5 es una proteína de 32-35 kDa, fosfolipasa A2, inhibidora de la proteína quinasa C, con actividad de canal de Ca^{++} y un papel potencial en la transducción de señales celulares, inflamación, crecimiento y diferenciación. Aunque es una proteína predominantemente intracelular, también se han determinado los niveles circulantes de ANXA5 en plasma, orina y en líquido cefalorraquídeo en individuos sanos.

La propiedad de la ANXA5 de unirse a residuos de fosfatidil serina cuando son expuestos a la superficie celular, hace que esté implicada en los procesos de activación plaquetaria y apoptosis [353]. Esta exposición de fosfatidil serina, *in vivo*, resulta en un aumento de la vía de la coagulación sanguínea y en una eliminación de células apoptóticas por fagocitosis. Gracias a esta propiedad, es ampliamente utilizada como herramienta para detectar apoptosis *in vitro* e *in vivo*, al mismo tiempo que se está comenzando a emplear en imagen molecular para monitorizar y localizar apoptosis en pacientes [354].

Experimentos *in vitro* e *in vivo* de fagocitosis muestran un papel de la ANXA5 como moduladora de fagocitosis, de reacciones inflamatorias y de la inducción de la inmunidad [355]. La ANXA5 se une con gran afinidad a la fosfatidil serina inhibiendo la fagocitosis de células apoptóticas y necróticas por los macrófagos, derivando la eliminación de estas células a las células dendríticas; lo que conlleva a su vez a la presentación de antígeno que desencadena los procesos inflamatorios y la producción de autoantígenos.

En cuanto a la actividad de ANXA5 en vías de señalización del Ca^{++} , se relaciona con la polimerización de actina vía complejo Arp2/3 (actin related protein complex 2/3). La polimerización de la actina puede mejorar la recolocación dinámica de proteínas de anclaje relacionadas con el citoesqueleto; de forma que las variaciones en los flujos de Ca^{++} se relacionan con una mayor expresión y relocalización de grupos de proteínas relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y la función inmune. Así, en relación con estas proteínas del citoesqueleto puede actuar en episodios celulares como cre-

cimiento celular, movimiento, apoptosis y regulación del sistema inmune (en relación con el tráfico de vesículas) [356].

En cuanto a la aterosclerosis se observa que la tinción para ANXA5 es intensa en tejidos patológicos con gran infiltración de células fagocíticas como es el caso de las lesiones ateroscleróticas; tiñendo principalmente macrófagos y células espumosas (por su unión a las LDL_{ox}) [352]. Asimismo, la unión de ANXA5 está relacionada positivamente con la aterosclerosis, medida por el grosor íntima media, y la presencia de placa; de forma que la contribución de la ANXA5 a la aterosclerosis se produce en estadios avanzados en los que apoptosis, fisuras y microtrombos, así como la activación de células endoteliales son comunes en la placa; llevando a la unión de la ANXA5 a las superficies expuestas [353]. La apoptosis puede prevenir la aterosclerosis reduciendo el contenido celular y el engrosamiento neointinmal de la placa; sin embargo, y al mismo tiempo, el aumento de la apoptosis puede volver las placas más vulnerables; especialmente en el borde donde el área fibrosa es más fina. La aterosclerosis puede considerarse como una respuesta a un daño, de forma que la ANXA5 puede contribuir tanto a la protección frente a la aterotrombosis (por su función anticoagulante cubriendo las superficies que expresan fosfatidil serina reduciendo su disponibilidad para reacciones procoagulantes) como a aumentar la aterosclerosis determinada por el espesor de la íntima media en etapas tardías. Así, la tinción de los microvasos en las placas parece estar indicando la predisposición a microtrombosis y la

desestabilización en el borde. En relación a estos procesos de inestabilidad, también aparece asociada esta proteína con la proliferación de CML [356].

En estudios a niveles sistémico se ha comprobado que las concentraciones plasmáticas de ANXA5 están aumentadas en pacientes en fase aguda de daño visceral, tal y como ocurre en el IAM [357]. De la misma manera se ha visto que las concentraciones plasmáticas de ANXA5 se correlacionan negativamente con el grado de estenosis coronaria; creyéndose que es debido a que la ANXA5 circulante se elimina por su unión a componentes específicos de la placa de ateroma, como LDLox o células dañadas, relacionándose de esta forma con la presencia y extensión de la lesión [358].

Al mismo tiempo, se ha encontrado un polimorfismo en el gen codificante de la ANXA5 que confiere protección en pacientes jóvenes de IAM, posiblemente por la mejoría en la traducción proteica que aumenta los niveles de ANXA5 [358].

En este estudio, la ANXA5 fue identificada en el estudio de proteómica como una diferencia cualitativa de expresión exclusiva en placas de ateroma en un ambiente inflamatorio sistémico. La confirmación inmunohistoquímica en placas de ateroma reveló la expresión de esta proteína en ambos grupos; observando una mayor intensidad en aquellas lesiones en un ambiente sistémico desfavorable. Estos resultados concuerdan con el papel de la ANXA5 en la aterosclerosis. De esta forma, la ANXA5 estaría indicando una mayor actividad celular en las placas de ateroma en un ambiente inflamato-

rio, traduciéndose en un mayor grado de apoptosis, mayor respuesta inflamatoria local y proliferaciones celulares como la de SMC. De este modo se demuestra la presencia de placas de ateroma muy activas, con fenómenos de remodelación que no hacen más que favorecer la ruptura de la placa de ateroma, exponiendo el material protrombótico a la circulación.

NP

La NP es una proteína enzimática de 84-94 kDa. Su función es catalizar la conversión reversible de un ribósido de purina a su base correspondiente: la inosina se convierte en hipoxantina y la guanosina en guanina. Estas 2 reacciones ocurren en el metabolismo humano y se conoce como: “vía de salvamento de las purinas”; que convierte las purinas y sus ribo y deoxiribonucleósidos en los correspondientes mononucleótidos. Está presente en el citoplasma y en las mitocondrias, y se expresa ampliamente en los tejidos humanos; aunque con mayor actividad en células de sangre periférica como eritrocitos, granulocitos y en el tejido linfoide [359] .

La deficiencia de la NP causa una inmunodeficiencia dependiente de linfocitos T [360]. Además, el análisis de los niveles de este enzima en sangre es un ensayo realizado comúnmente; de forma que se han descrito niveles elevados de NP en células tumorales en cáncer bucal, en relación a la agresividad biológica en carcinoma de colon, y en otros tumores. Sin embargo, existen pocos trabajos en cuanto a los niveles plasmáticos de NP encontrados en cáncer o en otras enfermedades. Por ello, el aumento de NP encontrado en plasma es incierto, si bien se cree que puede proceder de linfocitos y

macrófagos, dado que estas actividades se encuentran aumentadas durante la respuesta inmune celular normal, lo que podría reflejar un incremento similar de esta actividad en los linfocitos en el cáncer. Los macrófagos son ricos en NP, de forma que, también se asume que liberan la NP al torrente sanguíneo [359]. Todo esto hace que la NP sea una diana farmacológica en el tratamiento de células T cancerosas y en trastornos autoinmunes de células T [361].

En relación con la aterosclerosis la NP se ha encontrado que tiñe principalmente CML modificadas, y en mayor medida, macrófagos. Estas células positivas para NP se transforman en células espumosas y colaboran en el engrosamiento intimal. Además, aparecen diferencias en las CML con esta tinción; observando que aquellas CML modificadas de la íntima, poseen un fenotipo sintético debido a la actividad de este enzima [362].

También se ha encontrado que la NP es un buen marcador de daño oxidativo [363], pudiendo predecir daño orgánico en niveles elevados. Este estrés oxidativo, producido por ROS causa daño celular importante, principalmente a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las ROS se forman a través del metabolismo celular normal en la mayoría de tipos celulares, si bien su producción se ve acusada en determinadas condiciones, influyendo en diferentes mecanismos como disfunción celular y/o muerte, implicadas en numerosos procesos como la aterosclerosis.

El estrés oxidativo produce modificaciones químicas en el ADN cuando los nucleótidos quedan expuestos al mismo. Así, se ha demostrado que la oxo-

7,8-dihidroguanina(8-oxo-Gua) (nucleobase oxidada que causa mutaciones con más frecuencia al incorporarse al ADN) se puede incorporar a los ácidos nucleicos a través de la vías de salvamento de las purinas y por tanto a través de la NP [364].

El papel de la NP en la formación neointimal, por la proliferación y migración de CML, parece estar relacionado con las ROS, en base a la activación de vías específicas sensibles al estado redox [365].

En este estudio, la NP se identifica en el estudio proteómico como una diferencia cualitativa que se expresa exclusivamente en los restos de placa de ateroma en un ambiente inflamatorio. El análisis inmunohistoquímico de esta proteína reveló una tinción principalmente de los macrófagos presentes en la placa de ateroma, y de algunos fibroblastos; en consonancia con la función y localización de la proteína ya descritas. En ambos grupos estudiados se encontró reactividad frente a esta proteína, pero mayormente en un ambiente inflamatorio sistémico. En base a los resultados obtenidos para esta proteína, es posible determinar cómo afecta el ambiente sistémico inflamatorio a los mecanismos locales de la placa de ateroma. De esta forma, se confirma que ante tales condiciones inflamatorias se produce una reacción inflamatoria local más acusada en la placa de ateroma, resultando en una mayor generación de ROS, que contribuyen a la migración y proliferación de CML; mecanismos todos, que están colaborando activamente en el proceso de desestabilización y ruptura de la placa de ateroma.

TAGLN2

La TAGLN2 es una proteína de 22 kDa homóloga de la transgelina, uno de los marcadores más tempranos de diferenciación de músculo liso. Es una proteína de la familia de las calponinas (proteínas de unión al Ca^{++}), implicada en diferenciación celular.

En cáncer, dado el papel que juega en la diferenciación celular, se sugiere que su sobreexpresión está relacionada con la progresión tumoral, puesto que las líneas celulares inflamatorias más proliferativas son aquellas que más expresan TAGLN2 [366].

La proliferación de las CML vasculares es un factor que contribuye en los trastornos vasculares proliferativos como la aterosclerosis. Estas células son el principal componente de la pared de los vasos sanguíneos y exhiben principalmente 2 fenotipos: diferenciado o contráctil y no diferenciado o sintético. Mientras que el diferenciado es quiescente, el sintético muestra propiedades proliferativas. Normalmente las CML vasculares existen en estado diferenciado, contráctil para regular el tono vascular; pero pueden volverse proliferativas en respuesta a daño en la pared del vaso; cambio fenotípico que aparece relacionado con la expresión de TAGLN2 [367].

Esta proteína fue identificada también en estudios de búsqueda de marcadores de aterosclerosis en placas de ateroma humanas [368] y en líneas celulares de monocitos [369].

La TAGLN2 fue identificada en el estudio proteómico como una diferencia cuantitativa, presentando mayor expresión en aquellas placas complicadas en un ambiente sistémico inflamatorio. El análisis inmunohistoquímico confirmó este resultado, observando una mayor inmunoreactividad en aquellas lesiones en ambiente inflamatorio. Dadas las funciones y procesos en los que está implicada esta proteína, se demuestra de nuevo que el ambiente sistémico es uno de los determinantes que van a participar en el proceso de ruptura de la placa de ateroma, actuando sobre las propias características de la placa. De esta forma, una mayor expresión de TAGLN2 revela una mayor actividad celular en las placas de ateroma, principalmente de CML que presentan un estado proliferativo y sintético. Estos procesos activos, junto con la remodelación llevada a cabo por las CML vasculares, hace que la placa sea más vulnerable a la ruptura. Al mismo tiempo, esta mayor actividad también se refleja en las células inflamatorias, principalmente en macrófagos; contribuyendo a la desestabilización.

GSTK1

Las GST son una familia de enzimas intracelulares que catalizan la conjugación del glutatión con muchos compuestos exógenos y endógenos, incluyendo químicos carcinogénicos, fármacos y productos de estrés oxidativo. Además de su papel principal, catalizando la conjugación de sustratos electrofílicos al glutatión, estas enzimas tienen actividades peroxidasa glutatión dependiente e isomerasa. También tienen un papel no catalítico vía interacción con quinasas y sus propiedades de unión a un amplio espectro de li-

gandos endógenos y exógenos. Existen 8 familias en base a la homología en la secuencia proteica: Alpha, Mu, Pi, Theta, Kappa, Sigma, Zeta y Omega. Las GST solubles han sido descritas principalmente en el citoplasma, pero también están presentes en el núcleo y en la mitocondria donde juegan un papel importante para la integridad de estos orgánulos. En el núcleo juegan un papel importante en la protección del daño al ADN y en la mitocondria un papel importante en la defensa frente a sustancias químicas y de estrés oxidativo.

La clase kappa es la menos estudiada. Se observa en fracciones mitocondriales y de peroxisomas; pero no se encuentra en el citoplasma. Juega un papel importante en la detoxificación de lípidos peroxidados generados en los peroxisomas; además de participar en la detoxificación de ROS [370].

La aterosclerosis representa un estado de estrés oxidativo sostenido. Las ROS son mediadores clave de rutas de señalización que subyacen a la inflamación vascular en la aterogénesis; empezando desde el inicio con el desarrollo de la estría grasa y el progreso de la lesión, hasta la ruptura de la placa. Las modificaciones oxidativas de la pared arterial pueden contribuir a la progresión de estas lesiones cuando el balance entre oxidantes y antioxidantes favorece a los formadores [371]. Estos oxidantes pueden afectar a numerosas rutas redox-sensibles en las células vasculares, resultando en una alteración de la composición celular del tejido, induciendo la migración y proliferación de CML; así como la expresión de moléculas de adhesión y de factores quimiotácticos por el endotelio que proporcionan un ambiente

propicio para la infiltración local de células inmunes circulantes, resultando en inflamación crónica [372]. Por tanto, las GST son un mecanismo de defensa que protege la pared vascular del estrés oxidativo y del daño aterogénico [373].

De la misma manera, existen evidencias de que alteraciones en estas enzimas pueden estar relacionados con daños oxidativos mayores en el ADN; relacionados con el desarrollo y complicación de la aterosclerosis [374].

La GSTK1 fue identificada por proteómica como una diferencia cualitativa de expresión exclusiva en el material de placas de ateroma en un ambiente no inflamatorio. En este contexto, la presencia de esta proteína está indicando una mayor protección frente al estrés oxidativo en las placas de ateroma en un ambiente no inflamatorio. Por el contrario, aquellas lesiones en un ambiente inflamatorio tendrán afectados sus sistemas detoxificantes, de forma que los efectos adversos por las ROS estarán magnificados.

El estudio inmunohistoquímico de este enzima, revela un patrón de expresión acorde a las lesiones; es decir, una actividad de este enzima ante los mecanismos oxidativos que se están produciendo en la placa, con grandes acúmulos de células inflamatorias y de cristales de colesterol. Si bien no es concluyente en cuanto a la diferencia en expresión entre placas de ateroma desarrolladas en un ambiente inflamatorio frente a aquellas que se desarrollaron en ausencia de ambiente inflamatorio, dado el número elevado de casos negativos. La ausencia, o casi, de un ambiente inflamatorio sistémico parece que incide de forma positiva sobre los mecanismos locales de defen-

sa de la placa de ateroma, permitiendo el correcto funcionamiento de la maquinaria celular dedicada a la regulación de los daños por estrés oxidativo. Sin embargo, el ambiente inflamatorio sistémico parece estar contribuyendo a una mayor producción de ROS en cuanto a una mayor proliferación de células inflamatorias (principalmente macrófagos) y de CML. Una desregulación en la producción o el funcionamiento de este enzima hará que la maquinaria celular de estas lesiones se verá afectada en mayor grado por las ROS, afectando a procesos básicos del ciclo celular, aumentando la apoptosis y la proliferación celular; mecanismos que inciden de forma negativa en la estabilidad de la placa de ateroma.

Otras proteínas

BPGM

La BPGM es una proteína de aproximadamente 30 kDa. Es un enzima multifuncional que cataliza la síntesis de 2,3 bifosfoglicerato a través de su actividad sintetasa y su degradación por su actividad fosfatasa.

En el hombre este enzima aparece en eritrocitos y juega un papel fundamental en la disociación del oxígeno de la hemoglobina via 2,3 bifosfoglicerato, y está asociada directamente con la afinidad de la hemoglobina (Hb) por las moléculas de O₂. Alteraciones en la conformación de este enzima reducen la habilidad de los eritrocitos para liberar el O₂, llevando a la hipoxia del tejido [375].

En la patogénesis de la aterosclerosis los leucocitos y las plaquetas juegan un papel importante. Sin embargo, el papel de los eritrocitos no fue tenido en cuenta hasta estos los últimos años en los que se encuentra relación entre el contenido en colesterol de la membrana de los eritrocitos y niveles de colesterol en plasma de pacientes; y que la fagocitosis de los eritrocitos contribuye a la formación de células espumosas. De esta forma, surge la idea de que los eritrocitos constituyen un nuevo factor que contribuye al crecimiento y desestabilización de la placa. Así, se observa que la inyección intraplaca de eritrocitos (simulando hemorragias) inestabiliza las placas aumentando el contenido lipídico, el nivel de superóxidos, la infiltración de macrófagos y la producción de moléculas proinflamatorias; además de una disminución en el grosor del área fibrosa, aumentado consecuentemente la incidencia de ruptura de la placa de ateroma [376]. El aumento de eritrocitos podría actuar como una fuente de estrés oxidativo e inflamación por la liberación de lípidos oxidados, atrayendo más macrófagos a las placas, que a su vez resultaría en un aumento de MMP secretada que llevaría a la degradación de la matriz y a la atenuación del área fibrosa.

La BPGM se identifica por proteómica como una diferencia cuantitativa, mostrando una sobreexpresión en placas en un ambiente inflamatorio. La presencia de este enzima refleja una mayor presencia eritrocitaria en estas lesiones; lo que a su vez conlleva a una elevación de la actividad inflamatoria que se está produciendo en la placa de ateroma, y por consiguiente un au-

mento de los niveles de estrés oxidativo; ambos implicados en la ruptura de la placa de ateroma.

PSMB8

La PSMB8 es una proteína de aproximadamente 30 kDa. Pertenece al proteosoma, complejo multicatalítico con actividad proteasa dependiente de ubiquitina. La ubiquitinación de las proteínas es un mecanismo que las marca para su degradación por el proteosoma, envuelto en el recambio de proteína reguladoras y en la degradación selectiva de proteínas desnaturalizadas o mal plegadas; siendo por tanto un sistema de defensa celular. Tiene un papel importante en la regulación de numerosos procesos celulares (transducción de señales, progresión del ciclo celular, transcripción, apoptosis, endocitosis, presentación de antígeno en la inmunidad celular) y detoxificación de proteínas alteradas [377].

En relación con la aterosclerosis, se sabe que las LDL_{ox} pueden inducir cambios estructurales en las proteínas celulares, pudiendo afectar la viabilidad celular. El proteosoma actúa como mecanismo de defensa degradando estas proteínas alteradas estructural y funcionalmente. Sin embargo, en altas concentraciones de estas proteínas, tras una activación transitoria, la actividad del complejo es inhibida llevando a la acumulación de proteínas celulares alteradas y en último caso a la muerte celular [378].

La PSMB8 fue identificada en este estudio como una diferencia cualitativa por técnicas proteómicas, expresándose de forma exclusiva en placas de ateroma en un ambiente no inflamatorio. La presencia de esta proteína indica que la ausencia de inflamación permite el correcto funcionamiento, y potencia, los mecanismos celulares de defensa frente a las agresiones que se producen en la progresión y ruptura de la placa de ateroma. Estos mecanismos combaten principalmente los daños por el estrés oxidativo como consecuencia de la inflamación local derivada de la ruptura de la placa de ateroma, degradando las proteínas alteradas, y por tanto, permitiendo la supervivencia celular aumentando la estabilidad de la placa. Por el contrario, el ambiente inflamatorio sistémico que aumenta el daño celular, provoca la anulación de los mecanismos celulares de defensa, magnificando el daño celular por estrés oxidativo.

HP

La HP es una proteína de unos 45 kDa. La HP reduce la pérdida de Hb y hierro a través de la formación de un complejo Hb-HP que no es filtrado en los glomérulos; siendo transportado al hígado, por lo que es una proteína de fase aguda. La función in vivo de la HP es la de capturar y eliminar la Hb extracelular de la circulación sanguínea, previniendo su toxicidad en los componentes vasculares, sirviendo como un antioxidante vascular.

En relación con la aterosclerosis, la HP inhibe totalmente la actividad oxidante de la Hb hacia las LDL; funcionando como un agente antiaterosclerótico

[379]. Además, la HP juega un papel en la ruptura de la placa de ateroma por la liberación de Hb de los eritrocitos; lo que representa un estímulo para la inflamación en la placa, más aún teniendo en cuenta que la frecuencia de las hemorragias microvasculares es de hasta en un 40% en placas avanzadas. La HP une esta Hb extracorpúscular atenuando el efecto oxidativo e inflamatorio. Este es el único mecanismo para eliminar la Hb libre en la placa.

En el hombre existen 2 variantes del gen de la HP, que difieren en la eficiencia de unión de Hb; asociándose con diferencias en las propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras. Estas diferencias llevan a la acumulación de hierro y, por consiguiente, a un aumento de la oxidación de lípidos y de otros componentes celulares de la placa; de forma que el estrés oxidativo aparece de nuevo en el desarrollo de inestabilidad de la placa [380].

En este trabajo la HP fue identificada por proteómica como una diferencia cualitativa de expresión exclusiva en placas de ateroma en un ambiente inflamatorio sistémico. La presencia de esta proteína refleja el grado de inflamación local en la placa de ateroma, así como el proceso de trombosis derivado de la ruptura de la placa; de forma que el estrés oxidativo se verá aumentado en base a estos fenómenos, y debido a la liberación de la Hb, contribuyendo ambos procesos al daño oxidativo.

Visión conjunta

El proceso aterosclerótico tiene un carácter de respuesta linfoproliferativa en la que, los monocitos circulantes, los macrófagos subendoteliales y los linfocitos T, así como los mastocitos [381], juegan un papel clave tanto en la génesis como en la progresión y desestabilización de las lesiones ateromatosas. La activación de los macrófagos y linfocitos T estimula la liberación de MMP y otros enzimas proteolíticos que degradan la matriz extracelular, favorecen la proliferación de CML y lesionan los vasa vasorum provocando hemorragias intraplaca. Estos hechos sugieren un papel activo de la inmunidad celular en la lesión aterosclerótica.

En este contexto, la PCR-us, marcador de inflamación sistémica empleado en este estudio para la estratificación de los pacientes con placas de ateroma, se ha propuesto como un factor de riesgo independiente de aterosclerosis incluyendo el ictus, y se correlaciona positivamente con el grado de progresión de la aterosclerosis [166,329]. Pero estudios recientes parecen demostrar un papel directo en el proceso aterosclerótico [382]. De esta forma, se ha demostrado que los niveles de PCR-us inducen la respuesta inflamatoria. En células endoteliales humanas, la PCR inhibe la proliferación celular y aumenta la apoptosis de las mismas. En células mononucleares induce la producción de TNF- α , IL-1 β y MMP-9; de una manera concentración-dependiente. Por consiguiente, la PCR tiene un papel activo induciendo la apoptosis y la producción de mediadores inflamatorios; procesos críticos para la desestabilización de la placa de ateroma. Al mismo tiempo, las cito-

quinas proinflamatorias producidas por los macrófagos y las CML activadas, juegan un papel importante en la inflamación mantenida y en la formación de estas placas ateromatosas en la pared arterial; estimulando la producción de PCR y MMP por CML [383].

Los resultados encontrados en este estudio permiten indagar en los mecanismos moleculares subyacentes a la placa de ateroma en diferentes condiciones de inflamación sistémica.

En base a estos y a las proteínas identificadas, se puede determinar que el ambiente inflamatorio sistémico contribuye a la inestabilidad de la placa de ateroma y altera los procesos locales que en ella se desarrollan. Así, se encuentra un grado de inflamación local más marcada en condiciones inflamatorias sistémicas desfavorables, reflejado en una mayor expresión de ANXA5, de NP, de HP y en menor medida de TAGLN2, que indican una mayor presencia de células inflamatorias y macrófagos, así como de proliferación de CML. Esta respuesta inflamatoria va a resultar en unas condiciones de estrés oxidativo más marcadas derivadas de la mayor actividad celular; representadas por un aumento en la expresión de la NP, de la HP y de la BPGM. La liberación de las ROS va a provocar una mayor apoptosis celular reflejado principalmente por la ANXA5. Esta apoptosis junto con los procesos de proliferación y migración celular, va a ser crítica para la ruptura de la placa de ateroma [384]; poniéndose de manifiesto el papel importante que juega el estrés oxidativo en la aterosclerosis [349, 371].

Por el contrario, en condiciones de ausencia de inflamación sistémica se observa una mayor activación de los mecanismos de defensa, principalmente contra el estrés oxidativo, por parte de las placas de ateroma complicadas; reflejándose en una mayor expresión de la GSTK1 y de las PSMB8.

Resumen

La historia natural de la progresión y complicación de la placa aterosclerótica no está del todo clara debido a los inconvenientes de la naturaleza descriptiva de la investigación patológica y la falta de modelos animales con enfermedad aterosclerótica espontánea que reflejen la patología humana [350]. Este estudio está encaminado a la identificación de biomarcadores de placas con riesgo de ruptura y, por consiguiente, de aquellos pacientes con riesgo de sufrir un episodio clínico.

Puesto que la aterosclerosis es una enfermedad multifactorial asumir que un único biomarcador sistémico pueda ser suficiente para identificar estas placas vulnerables probablemente sea un planteamiento simplista; por lo que sería más adecuado combinar estos biomarcadores identificados en un test multimarcador para identificar estos pacientes con alto riesgo de sufrir un episodio cerebrovascular en una muestra de sangre periférica.

La identificación de estos biomarcadores de progresión de la enfermedad aterosclerótica puede facilitar el desarrollo y validación de terapias farmacológicas estabilizadoras de las placas de ateroma; dado que la modulación de estos mecanismos biológicos puede llegar a prevenir o retrasar la progresión de la aterosclerosis [385].

En conclusión, la identificación de estas proteínas (ANXA5, HP, NP, TAGLN2, BPGM, GSTK1, PSMB8) confirma la influencia del ambiente inflamatorio sistémico en la inestabilidad de la placa de ateroma, afectando pro-

cesos locales. Además, serán necesarios nuevos estudios para demostrar si la presencia de dichas proteínas en suero puede ser utilizada como biomarcador que prediga la inestabilidad de las placas en la prevención de episodios clínicos y, al mismo tiempo, estas proteínas podrían servir como dianas para imagen molecular.

CONCLUSIONES

1. El análisis proteómico del material capturado en los DPD es una aproximación válida para el estudio de la aterosclerosis.
2. El ambiente inflamatorio sistémico juega un papel activo muy importante en la progresión e inestabilización de la placa de ateroma, induciendo una expresión proteica diferencial.
3. El estrés oxidativo, derivado de los procesos locales de la placa de ateroma carotídea, parece ser uno de los principales mecanismos implicados en la desestabilización y ruptura de dicha placa.
4. Las proteínas identificadas por proteómica de expresión (ANXA5, NP, HP, GSTK1, PSMB8, TAGLN2, BPGM) son potenciales biomarcadores de inestabilidad de la placa de ateroma.

ANEXOS

Resultados de espectrometría de masas

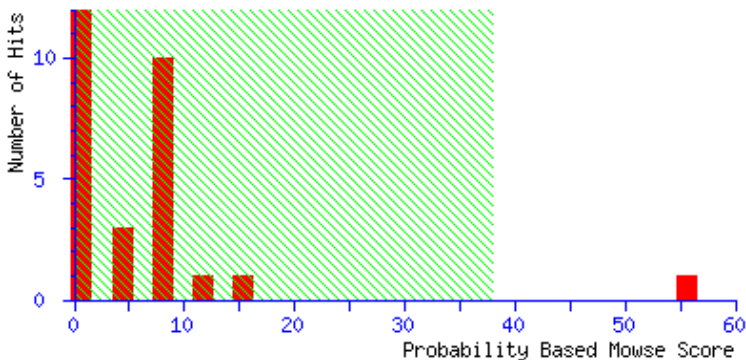
GSTK1

{MATRIX} *{SCIENCE}* Mascot Search Results

User :
 Email :
 Search title : SampleSetID: 7402, AnalysisID: 9928,
 Path=\070601\MSMS\D Brea Ivan SP
 Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
 Timestamp : 8 Jun 2007 at 21:34:08 GMT
 Significant hits: [Q9Y2Q3|GSTK1_HUMAN](#) Glutathione S-transferase kappa 1 (EC 2.5.1.18) (GST 13-13) (Glutathione S-transferase subunit 13)

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 38 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).



Index

1. [Q9Y2Q3|GSTK1_HUMAN](#) Mass: 25463 Total score: 56 Peptides matched: 2
 Glutathione S-transferase kappa 1 (EC 2.5.1.18) (GST 13-13) (Glutathione S-transferase subunit 13)

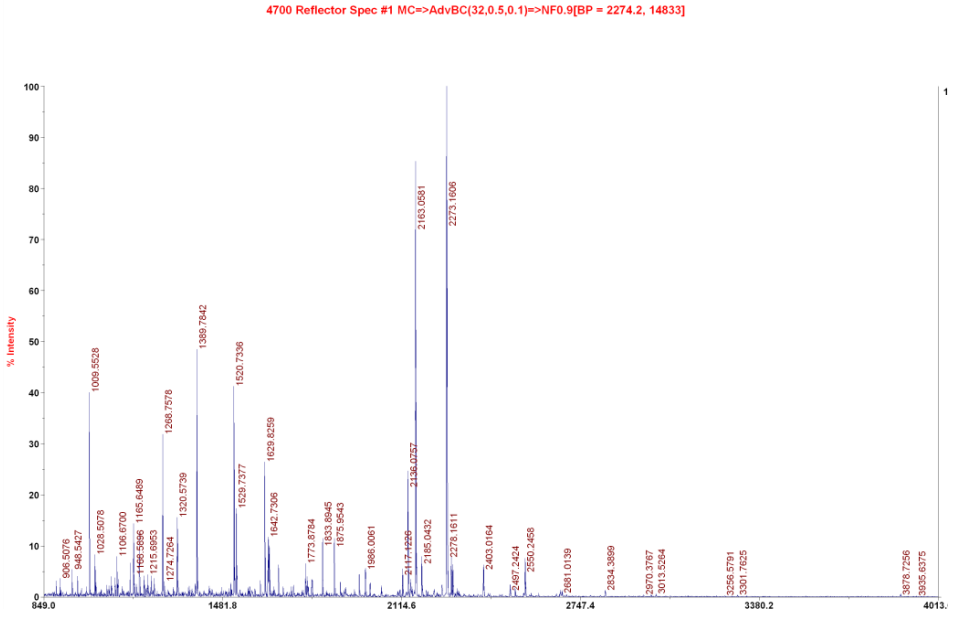


Ilustración 98. Espectro de MS para GSTK1.

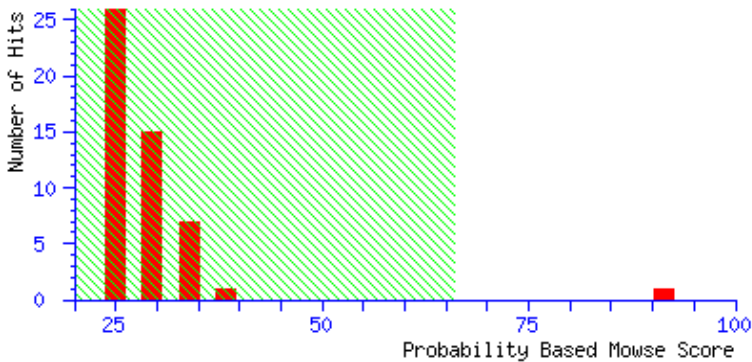
PSMB8

{MATRIX} *{SCIENCE}* Mascot Search Results

User :
 Email :
 Search title : SampleSetID: 7441, AnalysisID: 9932, MaldiWellID: 278561, SpectrumID: 727167, Path=\070601\combined\Dbrea Ivan
 Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
 Timestamp : 8 Jun 2007 at 22:55:44 GMT
 Top Score : 91 for **P28062|PSB8_HUMAN**, Proteasome subunit beta type 8 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome component C13) (Macropain subuni

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. P28062 PSB8_HUMAN	30677	91	Proteasome subunit beta type 8 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome component C13) (Macropain subuni

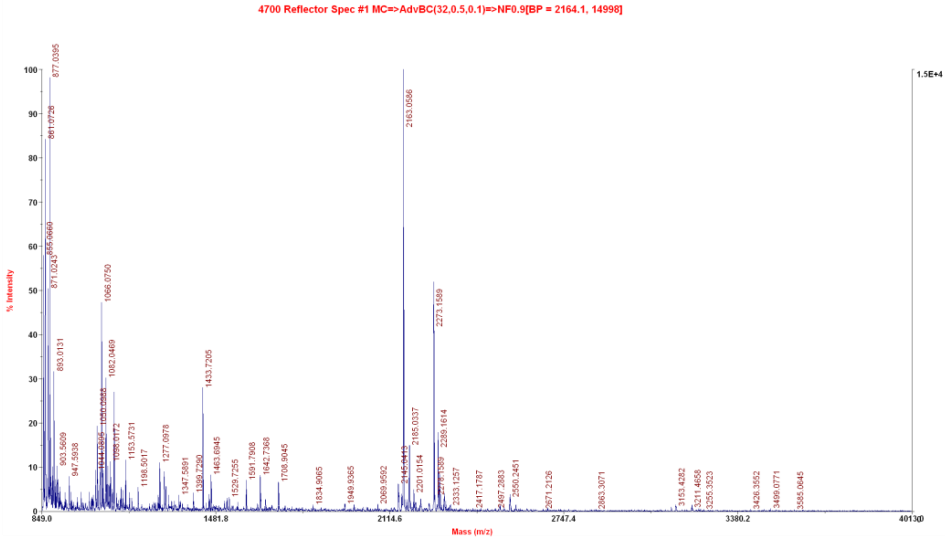


Ilustración 99. Espectro de MS para PSMB8.

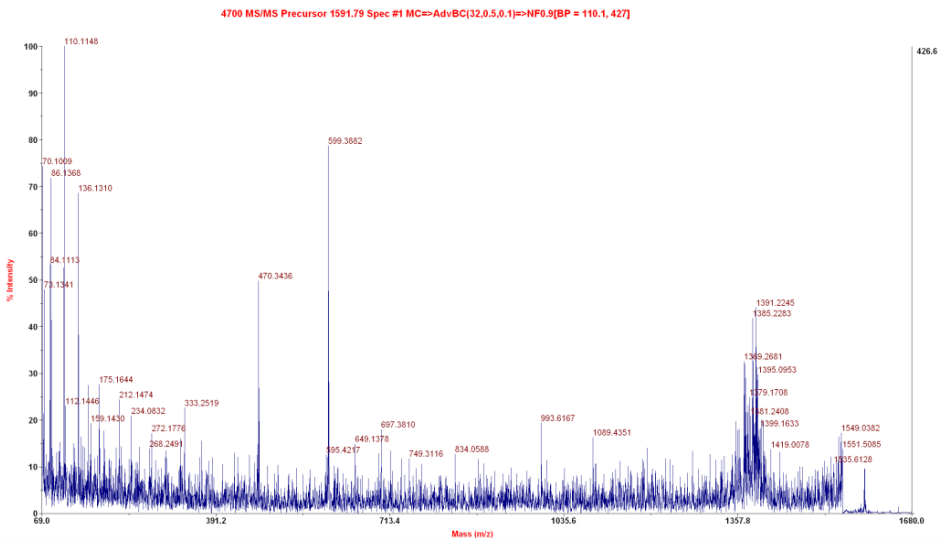


Ilustración 100. Espectro de MS/MS para un péptido de PSMB8.

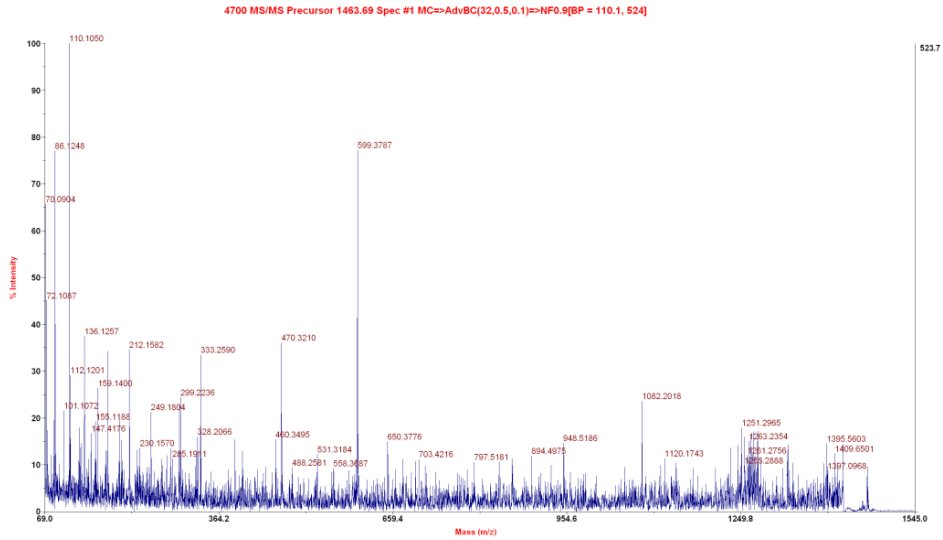


Ilustración 101. Espectro de MS/MS para un péptido de PSMB8.

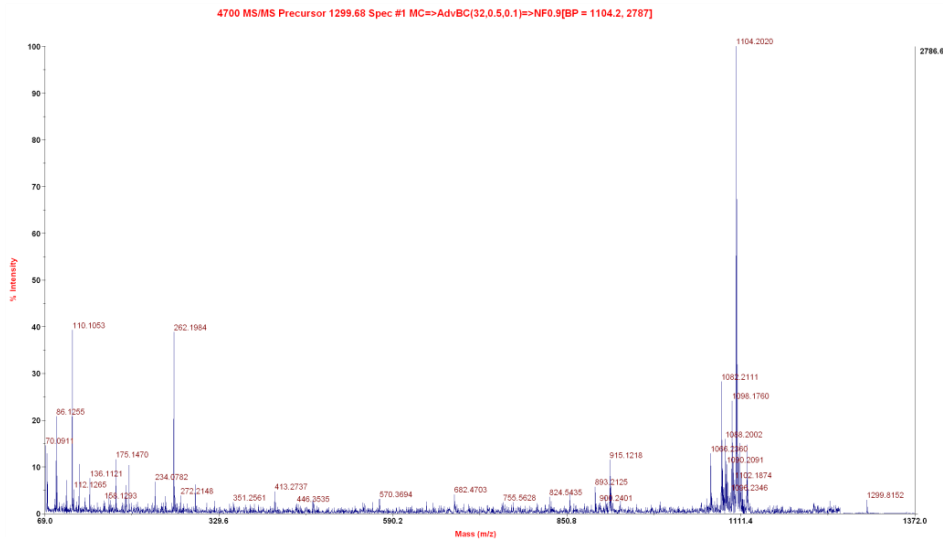


Ilustración 102. Espectro de MS/MS para un péptido de PSMB8.

ANXA5

{*MATRIX*}

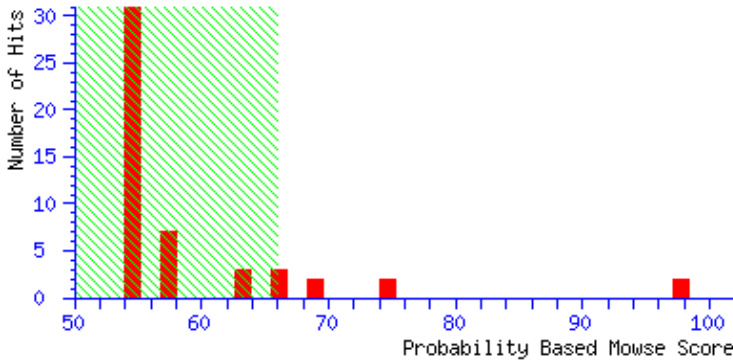
{*SCIENCE*}

 Mascot Search Results

User :
Email :
Search title : SampleSetID: 7281, AnalysisID: 9667, MaldiWellID: 275777, SpectrumID: 722078, Path=\070424\MS\ivan barba vero extracSP
Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
Timestamp : 9 May 2007 at 22:36:52 GMT
Top Score : 98 for **P08758|ANXA5_HUMAN**, Annexin A5 (Annexin V) (Lipocortin V) (Endonexin II) (Calphobindin I) (CBP-I) (Placental anticoagul

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. P08758 ANXA5_HUMAN	35840	98	Annexin A5 (Annexin V) (Lipocortin V) (Endonexin II) (Calphobindin I) (CBP-I) (Placental anticoagul

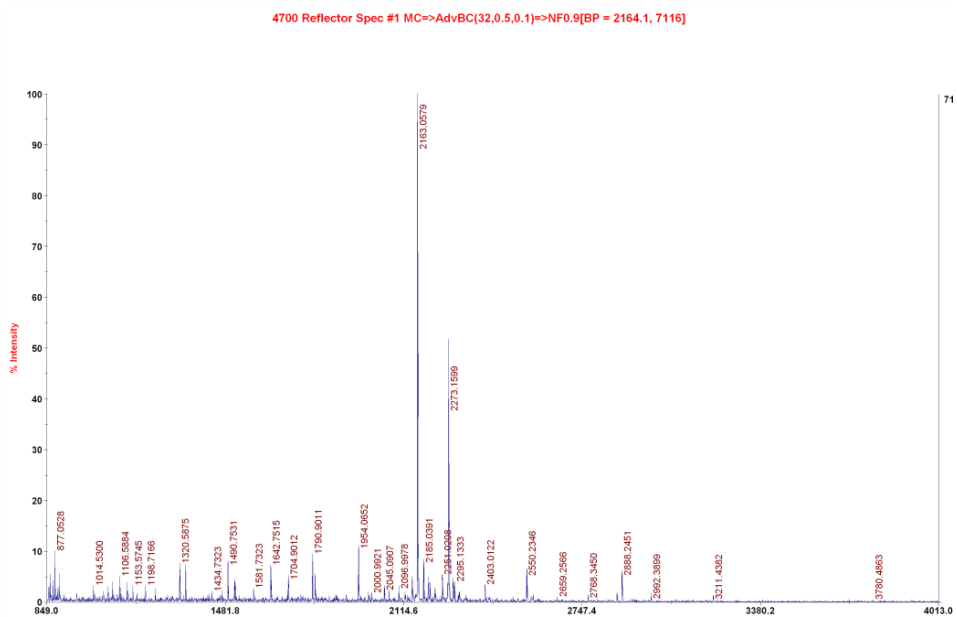


Ilustración 103. Espectro de MS para ANXAS.

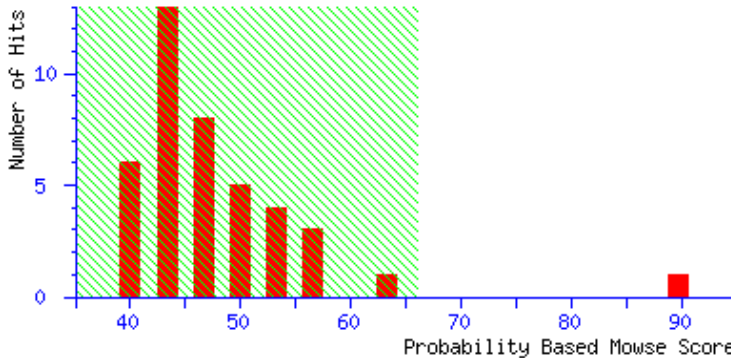
HP

{MATRIX}
{SCIENCE} Mascot Search Results

User : lola
Email : caiprote@pas.ucm.es
Search title : G5_MSMS_1857.9303_7.t2d - SpecView
Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
Timestamp : 11 May 2007 at 23:41:54 GMT
Top Score : 90 for **P00738|HPT_HUMAN**, Haptoglobin precursor
[Contains: Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain] - Homo sapiens (H)

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).

**Index**

1. **P00738|HPT_HUMAN** Mass: 45861 Total score: **90** Peptides matched: 9
Haptoglobin precursor [Contains: Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain] - Homo sapiens (H)

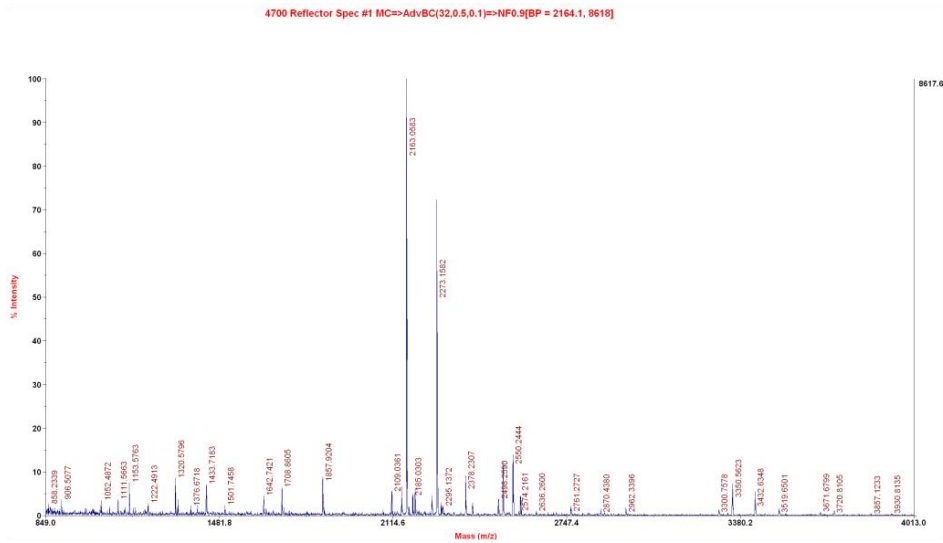


Ilustración 104. Espectro de MS para HP.

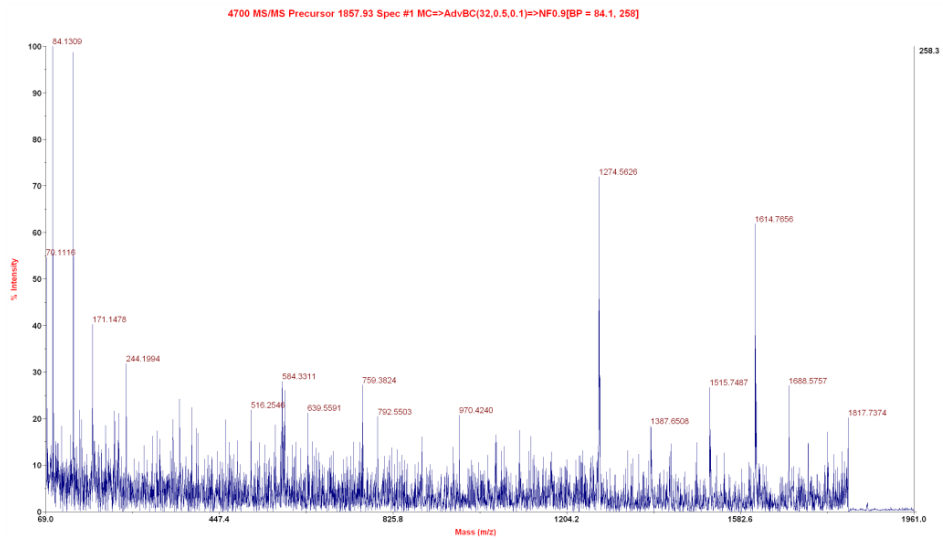


Ilustración 105. Espectro de MS/MS para un péptido de HP.

TAGLN2

{*MATRIX*}

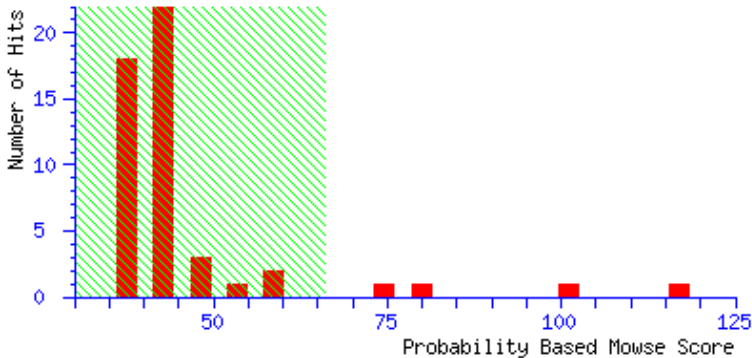
{*SCIENCE*}

 Mascot Search Results

User :
Email :
Search title : SampleSetID: 7281, AnalysisID: 9667, MaldiWellID: 275781, SpectrumID: 722080, Path=\070424\MS\ivan barba vero extracSP
Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
Timestamp : 9 May 2007 at 22:37:37 GMT
Top Score : 195 for **Mixture 1**, P37802|TAGL2_HUMAN + P00738|HPT_HUMAN

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. Mixture 1	195	P37802 TAGL2_HUMAN + P00738 HPT_HUMAN	
2. P37802 TAGL2_HUMAN	22417	117	Transgelin-2 (SM22-alpha homolog) - Homo sapiens (Human)
4. P00738 HPT_HUMAN	45861	78	Haptoglobin precursor [Contains: Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain] - Homo sapiens (H)

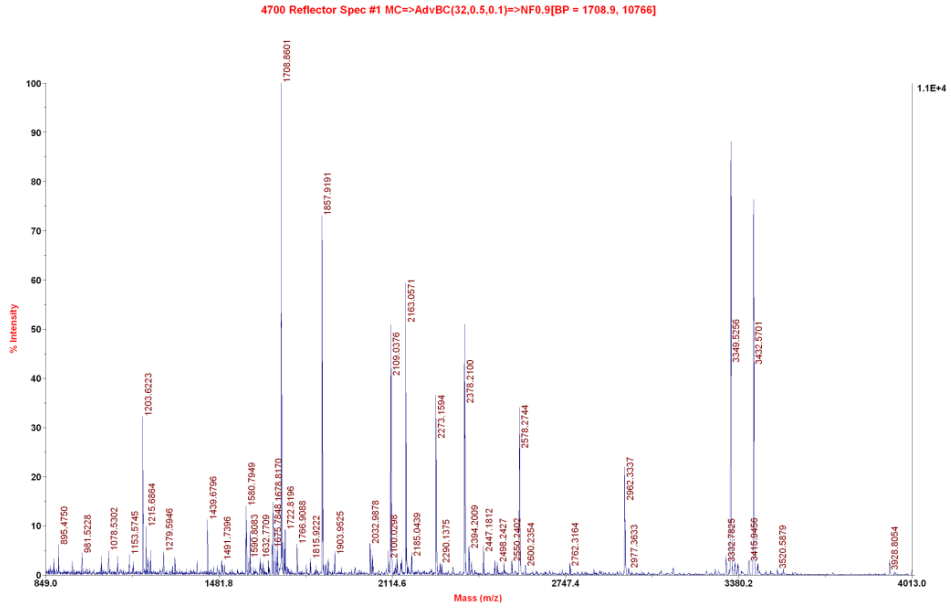


Ilustración 106. Espectro de MS para TAGLN2.

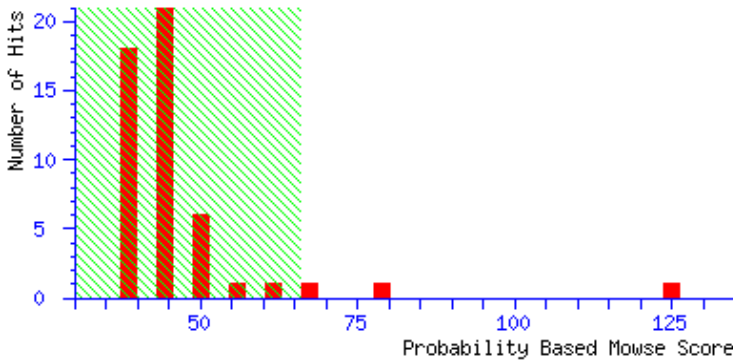
BPGM

{MATRIX} *{SCIENCE}* Mascot Search Results

User :
Email :
Search title : SampleSetID: 7281, AnalysisID: 9667, MaldiWellID: 275785, SpectrumID: 722083, Path=\070424\MS\ivan barba vero extracSP
Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
Timestamp : 9 May 2007 at 22:38:54 GMT
Top Score : 125 for **P07738|PMGE_HUMAN**, Bisphosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.4) (2,3-bisphosphoglycerate mutase, erythrocyte) (2,3-bisphosp

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. P07738 PMGE_HUMAN	30027	125	Bisphosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.4) (2,3-bisphosphoglycerate mutase, erythrocyte) (2,3-bisphosp

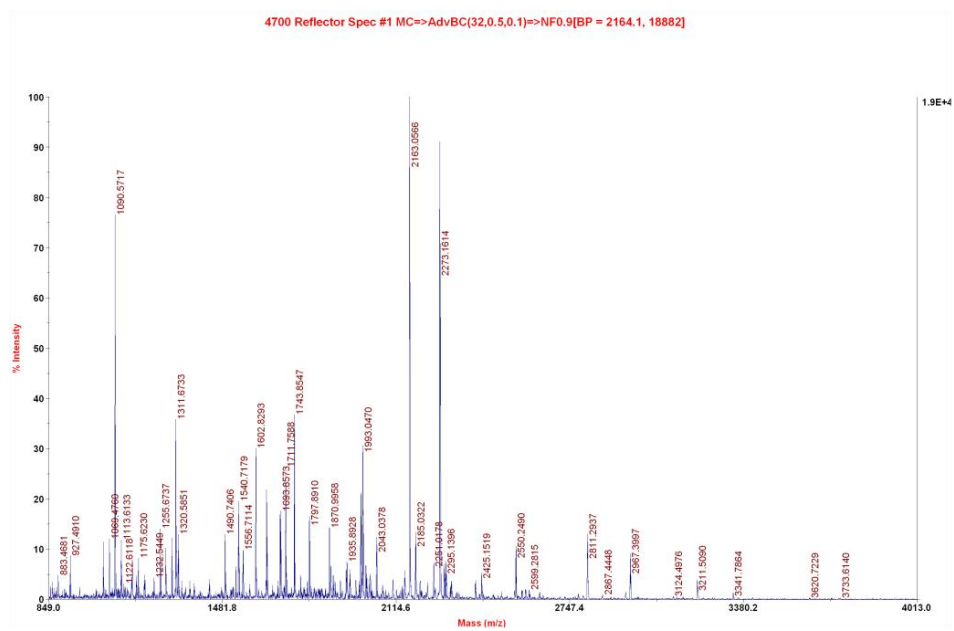


Ilustración 107. Espectro de MS para BPGM.

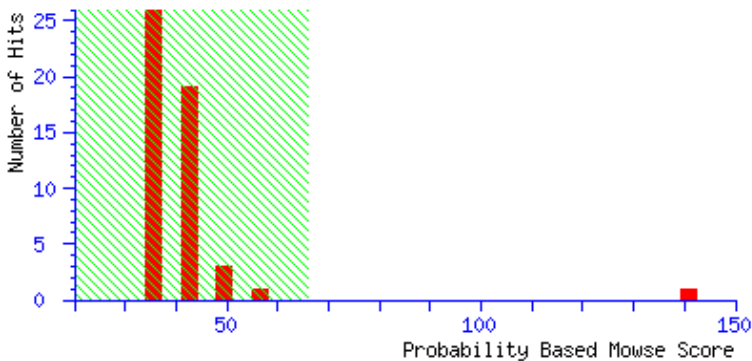
NP

{MATRIX}
{SCIENCE} Mascot Search Results

User :
Email :
Search title : SampleSetID: 7281, AnalysisID: 9667, MaldiWellID: 275787, SpectrumID: 722085, Path=\070424\MS\ivan barba vero extracSP
Database : SwissProt sprot (250296 sequences; 91444238 residues)
Timestamp : 9 May 2007 at 22:39:50 GMT
Top Score : 141 for **P00491|PNPH_HUMAN**, Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) (Inosine phosphorylase) (PNP) - Homo sapiens (Human)

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).

**Index**

Accession	Mass	Score	Description
1. P00491 PNPH_HUMAN	32325	141	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) (Inosine phosphorylase) (PNP) - Homo sapiens (Human)

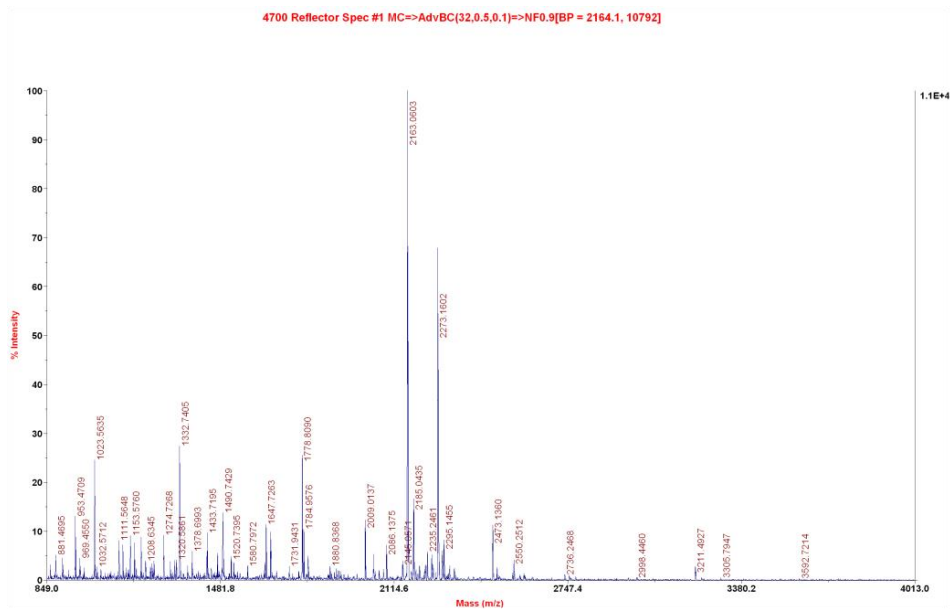


Ilustración 108. Espectro de MS para NP.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO MONICA Project, Principal Investigators. *The World Health Organisation MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration*. J Clin Epidemiol, 1988. 41: p. 105-114.
2. Instituto Nacional de Estadística. *Defunciones según la causa de muerte 2000*. www.ine.es.
3. Juffe Stein A, Castro Beiras A, Calvo Gómez C, Cortés Laiño JA, González Juanatey JR, Domínguez Sardina M, Puente Hernández J, López Rodríguez I, Gómara López S, Castillo Sánchez J, Fernández Villaverde JM, Varela-Portas Marió J, Seoane Díaz B, Hervada Vidal X. *Plan de saude de Galicia 2005-2009. Enfermedades do aparello circulatorio*.
4. López-Pousa S, Vilalta J, Llinás J. *Incidencia de la enfermedad vascular en España: estudio en un área rural de Girona*. Rev Neurol, 1995. 23: p. 1074-1080.
5. Olalla MT, Medrano MJ, Sierra MJ, Almazán J. *Time trends, cohort effect and spatial distribution of cerebrovascular disease mortality in Spain*. Eur J Epidemiol, 1999. 15: p. 331-339.
6. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabín J, en nombre del Comité de Redacción ad hoc del Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. *Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos*. Neurología, 2002. 17(Supl. 3): p. 3-12.
7. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. Stroke, 1993. 24: p. 35-41.
8. Ustrell-Roig Xavier, Serena Leal Joaquín. *Ictus. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares*. Rev Esp Cardiol, 2007. 60: p. 753-769.
9. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. *Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction*. Lancet, 1991. 22: p. 1521-1526.
10. Gorelick PH. *Stroke Prevention*. Arch Neurology, 1995. 52: p. 347-355.
11. Medrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodríguez M. *Factores de riesgo cardiovascular en población española: metaanálisis de estudios transversales*. Med Clin (Barc), 2005. 124: p. 606-612.
12. del Barrio JL, Medrano MJ, Arce A, Bergareche A, Bermejo F, Díaz J, Gascón J, García FJ, Garré J, Gómez C, Lobo A, Martínez A, Otero A, Reñé R, Sánchez MI, Saz P, Vega S, Vilalta-Franch J, Zunzunegui MV, de Pedro J. *Prevalencia de factores de riesgo vascular en poblaciones españolas de 70 años y más*

- en estudios puerta a puerta de enfermedades neurológicas. *Neurología*, 2007. 22: p. 138-146.
13. Arboix A, García-Eroles L, Oliveres M, Massons JB, Targa C. *Clinical predictors of early embolia recurrence in presumed cardioembolic stroke*. *Cerebrovasc Dis*, 1998. 8: p. 345-353.
 14. Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. *Possibility of stroke: A risk profile from the Framingham Study*. *Stroke*, 1991. 22: p. 312-318.
 15. Siesjö BK, *Cerebral circulation and metabolism*. *J Neurosurg*, 1984. 60: p. 883-908.
 16. Pulsinelli W. *Pathophysiology of acute ischemic stroke*. *Lancet*, 1992. 339(S): p. 533-536.
 17. Heiss WD, Graf R. *The ischemic penumbra*. *Curr Opin Neurol*, 1994. 7: p. 11-19.
 18. Castillo J. *Patología cerebrovascular isquémica*, en *Fisiopatología de la circulación cerebral*. Noya M, Castillo J, Editor. Repro Disseny: Barcelona, 1993. p. 59-66.
 19. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. *Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra*. *Stroke*, 1981. 12: p. 723-725.
 20. Powers WJ. *The ischemic penumbra: usefulness of PETT*, en *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke II*. Del Zoppo GJ, Mori E, Hacke W, Editor. Springer – Verlag, 1: Berlin, 1993. p. 17-21.
 21. Hossman KA. *Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia*. *Ann Neurol*, 1994. 36: p. 557-565.
 22. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. *The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke*. *Ann Neurol*, 1994. 36: p. 553-554.
 23. Castillo J. *Intervenciones diagnósticas y terapéuticas en las primeras seis horas de la isquemia cerebral. Tiempos de latencia. Intervención prehospitalaria*. *Neurología*, 1995. 10(2): p. 1-7.
 24. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F. *Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets of neuroprotective drugs*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001. 21: p. 1013-1033.
 25. Ginsberg MD. *Injury mechanism in the ischaemic penumbra. Approaches to neuroprotection in acute ischemic stroke*. *Cerebrovasc Dis*, 1997. 7(2): p. 7-12.
 26. Castillo J. *Bioquímica de la isquemia cerebral*. *Neurología*, 1999. 14(4): p. 17-23.
 27. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. *Nitric oxide synthase in models of focal ischemia*. *Stroke*, 1997. 28: p. 1283-1288.

28. Zhang J, Dawson VL., Dawson TM, Snyder SH. *Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity*. Science, 1994. 263: p. 687-689.
29. Castillo J, Dávalos A, Naveiro J, Noya M. *Neuroexcitatory aminoacids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke*. Stroke, 1996. 27: p. 1060-1065.
30. Schwartz-Bloom RD, Sah R. *Aminobutyric acid A neurotransmission and cerebral ischemia*. J Neurochem, 2001. 77: p. 353-371.
31. MacManus JP, L.M., *Gene expression induced by cerebral ischemia: An apoptotic perspective*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17: p. 815-852.
32. Mattson MP, Culmsee C, Tu ZF. *Apoptotic and antiapoptotic mechanism in stroke*. Cell Tissue Res, 2000. 301: p. 173-187.
33. Blanco M. *Búsquedas de nuevas dianas terapéuticas en el ictus isquémico: Factor de necrosis tumoral y su papel en la tolerancia cerebral isquémica humana*. Tesis en Medicina. Universidad de Santiago de Compostela: Santiago de Compostela, 2003.
34. An G, Lin TN, Liu JS, Xue JJ, He YY, Hsu CY. *Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia*. Ann Neurol, 1993. 33: p. 457-464.
35. Scheneider GH, Baethmann A, Kempfski O. *Mechanism of glial swelling induced by glutamate*. Can J Physiol Pharmacol, 1992. 70(S): p. 334-343.
36. Lees GC. *The posible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia*. J Neurol Sci, 1993. 114: p. 119-122.
37. Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ. *Hypoxia-induced vascular endothelial growth expression in normal rat astrocyte cultures*. Glia, 1995. 14: p. 87-93.
38. DeGraba TJ. *The role of inflammation after acute stroke. Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy*. Neurology, 1998. 51(Suppl. 3): p. 62-68.
39. Rothwell NJ, Bersbridge NJ, Lefevre RA, Hardwich AJ, Gauldie J, Hopkins SJ. *Interleukin 6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat*. Can J Physiol Pharmacol, 1991. 69: p. 1465-1469.
40. Smith CW. *Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation*. Can J Physiol Pharmacol, 1993. 71: p. 76-87.
41. Fujimara M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. *Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-barrier disruption in mice after focal cerebral ischemic and reperfusion*. Brain Research, 1999. 842: p. 92-100.
42. Montaner J, Álvarez-Sabín J, Molina CA, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. *Matrix metalloproteinase expresión is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke*. Stroke, 2001. 32: p. 2762-2767.

43. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamio K, Suda T. *Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption.* *Endocrinology*, 1998. 139: p. 1338-1345.
44. Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L. *Endothelins: A role in cerebrovascular diseases?* *Cephalalgia*, 1994. 14: p. 259-265.
45. Fischer EG, Ames A, Hedley-Whyte ET, O'Gorman S. *Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the "no-reflow phenomenon".* *Stroke*, 1997. 8: p. 36-39.
46. Marín J, Abella J, Leira R, Aneiros A, Serena J, Dávalos A, Castillo J. *Marcaadores bioquímicos de los signos tomográficos precoces de isquemia cerebral.* *Neurología*, 2001. 16: p. 448.
47. Castillo J, Dávalos A, Noya M. *Progression of ischaemic stroke and excitotoxic amino acids.* *Lancet*, 1997. 349: p. 79-83.
48. Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar JM, Castellanos M, Dávalos A. *Neurological deterioration in acute lacunar infarctions. The role of excitatory and inhibitory neurotransmitters.* *Stroke*, 2001. 32: p. 1154-1161.
49. Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernández-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. *Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarcts.* *Neurology*, 2000. 54: p. 1568-1574.
50. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. *Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke.* *Stroke*, 2000. 31: p. 2325-2329.
51. Castillo J, Leira R. *Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful?* *Cerebrovasc Dis*, 2001. 11(Suppl. 1): p. 40-48.
52. Castellanos M, Castillo J, García MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, Dávalos A. *Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions.* *Stroke*, 2002. 33: p. 982-987.
53. Castillo J, Rodríguez I. *Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice.* *Cerebrovasc Dis*, 2004. 17(Suppl. 1): p. 7-18.
54. Toni D, Fiorelli M, Bastianello S, Sachetti ML, Sette G, Argentino C, Montinaro E, Bozzao L. *Hemorrhagic transformation of brain infarct: Predictability in the first 5 hours from stroke onset and influence on clinical outcome.* *Neurology*, 1996. 43: p. 341-345.

55. Laure V, Von Kummer R, Del Zoppo G. *Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study*. Stroke, 1997. 28: p. 957-960.
56. Hamman GF, Okada Y, del Zoppo GJ. *Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1996. 16: p. 1373-1378.
57. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. *Proteolytic cascade enzymes increased in focal cerebral ischemia in rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 1996. 16: p. 360-366.
58. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. *Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke*. Stroke, 2003. 34: p. 40-46.
59. Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, Dávalos A. *Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke*. Stroke, 2004. 35: p. 1671-1676.
60. Strandness DR Jr. *Historical Aspects*, en *Duplex scanning in Vascular disorders*. Raven Press: New York, 1993. p. 1-26.
61. Planiol TH, Pourcelot L. *La circulation carotidienne et cerebral*. Nouv Presse Med, 1973. 2: p. 27.
62. Pourcelot L. *Indications de l'ultrasonografie Doppler dans l'étude des vaisseaux peripheriques*. RP, 1975. 25: p. 4671-4680.
63. Barber FE, B.D., Strandness DE Jr. *Duplex scanner II: for simultaneous imaging of artery tissues and flow*. in *Ultrasonics Symposium Proceedings*. 1974.
64. Zikerler RE, Strandness D, Felix WR. *Carotid Artery Disease : Detection by Doppler, Imaging and Sound spectral Analysis*, en *Non Invasive Diagnosis of Peripheral Vascular Disease*, Felix WR, Editor. Raven Press: New York, 1988. p. 107-126.
65. Strandness DE Jr. *Extracranial Arterial Disease: Duplex Scanning in Vascular Disorders*. New York: Raven Press, 1990. 92-100.
66. Fujitani WR, Mills JL, Wang LM, Taylor SM. *The effect of unilateral internal carotid arterial occlusion upon contralateral duplex study: criteria for accurate interpretation*. J Vasc Surg, 1992. 16: p. 459-463.
67. Moneta GL, Edwards JM, Chitwood RW, Taylor LM Jr, Lee RW, Cummings CA, Porter JM. *Correlation of North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) angiographic definition of 70 % to 99 % internal carotid stenosis with duplex scanning*. J Vasc Surg, 1995. 17: p. 152-159.
68. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J,

- Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler E. *Carotid Artery Stenosis: Gray-Scale and Doppler US Diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference*. Radiology, 2003. 229: p. 340-346.
69. Fernández Valenzuela V, Bellmunt Montoya S, Escribano Ferrer JM, Juan Samsó J, Allegue Allegue N, Alvarez Sabín J, Matas Docampo M. *Indicaciones de endarterectomía carotídea sin arteriografía. Estudio de validación mediante eco-Doppler*. Rev Neurol, 2000. 31: p. 412-416.
70. Sitzer M, Siebler M, Steinhilber H. *Non-invasive Evaluation of internal Carotid Stenosis with Colour Doppler-Assisted Duplex Imaging*. Clin Radiol, 1996. 51: p. 24-27.
71. Crosgrove D. *Why Do We Need Contrast Agents For Ultrasound?* Clin Radiol, 1996. 51: p. 1-4.
72. Escribano Ferrer JM, Juan Samsó J, Royo Serrando J, Fernández Valenzuela V, Bellmunt Montoya S, Matas Docampo M. *Use of ultrasound contrast in the diagnosis of carotid artery occlusion*. J Vasc Surg, 2000. 31: p. 736-741.
73. Saber JL, Feldman E. *Basic transcranial doppler examination : Technique and anatomy*, en *Transcranial Doppler Ultrasonography*. Wechsler L, Babikian VL, Editor. Missouri: Mosby Year Book: St. Louis, 1993. p. 11-28.
74. Molina C. *Doppler transcraneal en el ictus isquémico: accidente isquémico transitorio y el infarto cerebral*, en *Manual de Doppler transcraneal*. Aula Médica: Barcelona, 2000. p. 97-104.
75. Cummings MJ, Morrow IM. *Carotid artery stenosis: prospective comparison of CT angiography and conventional angiography*. Am J Roentgenol, 1994. 163: p. 517-523.
76. Marks MP, Napel S, Jordan TE, Enzann DR. *Diagnosis of carotid artery disease: preliminary experience with maximum-intensity projection spiral CT angiography*. AJR Am J Roentgenol, 1993. 160: p. 1267-1271.
77. Polak JF, Kalina P, Donaldson MC, O'Leary DH, Whittemore AD, Mannick JA. *Carotid Endarterectomy: Preoperative evaluation of candidates with combined color sonography and MRA*. Radiology, 1993. 186: p. 333-338.
78. Cairols MA, Cotillas J, Miralles M, Dolz J LL, Capdevila A. *Accuracy of duplex scanning, arteriography and MRA for carotid imaging in surgical patients*, en *Vascular imaging for Surgeons*, Greehalgh, Editor. Saunders: London, 1995. p. 107-119.
79. Lusis AJ. *Atherosclerosis*. Nature, 2000. 407: p. 233-241.
80. Mehrabian M, Wen P-Z, Fislis J, Davis RC, Lusis AJ. *Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model*. J. Clin. Invest., 1998. 101: p. 2485-2496.

81. Goldbourt UN, Neufeld HN. *Genetic aspects of arteriosclerosis*. Arteriosclerosis, 1988. 6: p. 357-377.
82. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. *Textbook of Cardiovascular Medicine*. Topol EJ, Editor. Lippincott-Raven: Philadelphia, 1998. p. 2389-2413.
83. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfield ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. *A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. 89: p. 2462-2478.
84. Nievelstein PFEM, Fogelman A, Mottino G, Frank J. *An ultrastructural study o lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit*. Arterioscler Thromb, 1994. 14: p. 1151-1161.
85. Camejo G, Camejo E, Olsson U, Bondjers G. *Proteoglycans and lipoproteins in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1993. 4: p. 385-391.
86. Steinberg D. *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. 272: p. 20963-20966.
87. Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990's*. Nature, 1993. 362: p. 801-809.
88. Ross R. *Atherosclerosis: An inflammatory disease*. N. Engl. J. Med., 1999. 340: p. 115-126.
89. Libby P. *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. 420: p. 868-874.
90. Valente AJ, Rozek MM, Sprague EA, Schwartz CJ. *Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A specialrole for monocyte hemotactic protein-1*. Circulation, 1992. 86: p. 20-25.
91. Barnes PJ, Karin M. *Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. N. Engl. J. Med., 1997. 336: p. 1066-1071.
92. Collins T. *Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion*. Lab Invest, 1993. 68: p. 499-508.
93. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. J Clin Invest, 1996. 97: p. 1715-1722.
94. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berniler JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins*. Nature, 1990. 344: p. 254-257.
95. Vora DK, Fang ZT, Parhami F, Fogelman AM, Territo MC, Berliner JA. *P-selectin induction by MM-LDL and its expression in human atherosclerotic lesions*. Circulation, 1994. 90: p. Y-83.

96. Cybulsky MI, Grimbone MAJ. *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. 251: p. 788-791.
97. Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GK. *Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferongamma*. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1995. 15: p. 1995-2002.
98. Brown MS, Goldstein JL. *Scavenging for receptors*. Nature, 1990. 343: p. 508-509.
99. Parthasarthy S, Barnett J, Fong LG. *High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1044: p. 275-283.
100. Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V. *High density lipoprotein in plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits*. Lab Invest, 1989. 60: p. 455-461.
101. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Jacobs JD Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. *High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease*. Circulation, 1989. 79: p. 8-15.
102. Freedman D, Newman WI, Tracy R. *Black-white differences in aortic fatty streaks in adolescence and early adulthood: the Bogalusa heart study*. Circulation, 1988. 77: p. 856-864.
103. Murakami T, Yamada N. *Modification of macrophage function and effects on atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1996. 7: p. 320-323.
104. Libby P, Ross R. *Cytokines and growth regulatory molecules in atherosclerosis, en Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Fuster V, Ross R, Topol EJ, Editor. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996. p. 585-594.
105. Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Montani AS, Reidy MA, Ross R. *Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF*. Science, 1991. 253: p. 1129-1132.
106. Björkerud S, Björkerud B. *Growth-stimulating effect of lipoproteins on human arterial smooth-muscle cells and lung fibroblasts is due to apo B-containing lipoproteins, type LDL and VLDL, and requires LDL receptors*. Biochim Biophys Acta, 1995. 1268: p. 237-247.
107. Llorente-Cortes V, Martínez-González J, Badimon L. *Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors*. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998. 18: p. 738-746.
108. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Hurt-Camejo E, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. *Human coronary smooth muscle cells internalize versican-*

- modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002. 22: p. 387-393.
109. Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. *Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. Atherosclerosis*, 1997. 130: p. 133-142.
 110. Bahadori L, Milder J, Gold L, Botney M. *Active macrophage-associated TGF-beta colocalizes with type I procollagen gene expression in atherosclerotic human pulmonary arteries. Am J Pathol*, 1995. 146: p. 1140-1149.
 111. Bombeli T, Schwartz BR, Harlam JM. *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb-IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha\beta 3$ integrin, and GPIIb. J Exp Med*, 1998. 187: p. 329-339.
 112. Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Varela O, Badimon L. *Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products. Eur J Clin Invest*, 2001. 31(b): p. 939-949.
 113. Stary H. *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. Arteriosclerosis*, 1989. 9: p. 1-19.
 114. Davies SW, Marchant B, Lyons JP, Timmis AD, Rothman MT, Layton CA, Balcon R. *Coronary lesion morphology in acute myocardial infarction: demonstration of early remodeling after streptokinase treatment. J Am Coll Cardiol*, 1990. 16: p. 1079-1086.
 115. Falk E. *Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. Brit Heart J*, 1983. 50: p. 127-134.
 116. Richardson PD, Davies MJ, Born GVR. *Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. Lancet*, 1989. 2: p. 941-944.
 117. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. *Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. Circulation*, 1992. 86(b): p. 74-85.
 118. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. *Coronary Atherosclerosis: A multifactorial disease. Circulation*, 1993. 87(II): p. 3-16.
 119. Falk E. *Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Circulation*, 1985. 132: p. 6-13.
 120. Virmani R, Kolodgie F, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for*

- atherosclerotic lesions*. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000. 20: p. 1262-1275.
121. Patterson JC. *Capillary rupture with intimal hemorrhage as a causative factor in coronary thrombosis*. *Arch Pathol*, 1938. 25: p. 474-487.
 122. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes*. *N. Engl. J. Med.*, 1992. 326(b): p. 310-331.
 123. Lutgens E, van Suylen R, Faber BC, Gijbels MJ, Eurlings PM, Bijmens AP, Cleutjens KB, Heeneman S, Daemen MJ. *Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process?* *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000. 23: p. 2123-2130.
 124. van der Wal AC, Becker A, van der Loos CM, Das PK, van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. *Site of intimal rupture or erosion of thrombotic coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. *Circulation*, 1994. 89: p. 36-44.
 125. Hosono M, de Boer O, van der Wal AC, van der Loos CM, Teeling P, Piek JJ, Ueda M, Becker AE. *Increased expression of T cell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction*. *Atherosclerosis*, 2003. 168: p. 73-80.
 126. Glass CK, Witztum JL. *Atherosclerosis: the road ahead*. *Cell*, 2001. 104: p. 503-516.
 127. Vainas T, Lubbers T, Stassen FR, Hengreen SB, Dieijen-Visser MP, Bruggeman CA, Kitslaar PJ, Schurink GW. *Serum C-reactive protein level is associated with abdominal aortic aneurysm size and may be produced by aneurysmal tissue*. *Circulation*, 2003. 107: p. 1103-1105.
 128. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. *P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *J Exp Med*, 2000. 191: p. 189-194.
 129. Burger PC, Wagner DD. *Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development*. *Blood*, 2003. 101: p. 2661-2666.
 130. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. *Lack of Interleukin-1 beta decreases the severity of atherosclerosis in apoE-deficient mice*. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003. 23: p. 656-660.
 131. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B, Humbert Y, Chvatchko Y, Tedgui A. *Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signal-*

- ing modulates atherosclerotic lesion development and stability.* Circ Res., 2001. 89(e): p. 41-45.
132. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Koteliansky VE, Flavell RA. *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis.* Nat Med, 1999. 5: p. 1313-1316.
133. Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. *Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype.* Proc Natl Acad Sci USA, 2000. 97: p. 7464-7469.
134. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling.* Nature, 1998. 394: p. 200-203.
135. Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH. *Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse.* Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 2003. 23: p. 454-460.
136. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice.* Circulation, 2002. 106: p. 2700-2706.
137. Dawson TC, Kuziel W, Osahar TA, Maeda N. *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Atherosclerosis, 1999. 143: p. 205-211.
138. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.* J Clin Invest, 1998. 101: p. 353-363.
139. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. *Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis.* J Clin Invest, 2003. 111: p. 333-340.
140. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. *Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice.* Circulation, 2003. 107: p. 1009-1016.
141. Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Tararak E, Condrón M, Kostolias G. *Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions: colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development.* Circulation, 1999. 99: p. 2883-2891.

142. Tashiro H, Shimokawa H, Sadamatu K, Yamamoto K. *Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor-beta in patients with coronary artery disease.* Coron Artery Dis., 2002. 13: p. 139-143.
143. Galis ZS, Khatri JJ. *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.* Circ Res., 2002. 90: p. 251-262.
144. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schonbeck U. *Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling.* Circulation, 2001. 104: p. 1899-1904.
145. Sukhova GK, Simon GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. *Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells.* J Clin Invest, 1998. 102: p. 576-583.
146. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, Libby P, Chapman HA. *Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms.* J Clin Invest, 1999. 104: p. 1191-1197.
147. Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Kotliansky VE, Daemen MJ. *Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression.* Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 2002. 22: p. 975-982.
148. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice.* Circ Res., 2001. 89: p. 930-934.
149. Lemaitre V, O'Byrne TK, Borczuk AC, Okada Y, Tall AR, D'Armiento J. *ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis.* J Clin Invest, 2001. 107: p. 1227-1234.
150. Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR. *Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1(MMP-3) gene inactivation.* Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 2001. 21: p. 1440-1445.
151. Lemaitre V, Soloway PD, D'Armiento J. *Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1.* Circulation, 2003. 107: p. 333-338.
152. Jormsjo S, Wuttge DM, Sirsjo A, Whatling C, Hamsten A, Stemme S, Eriksson P. *Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Am J Pathol, 2002. 161: p. 939-945.

153. Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P, Shi GP. *Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. J Clin Invest, 2003. 111: p. 897-906.
154. Khrenov AV, Ananyeva NM, Griffin JH, Saenko EL. *Coagulation pathways in atherothrombosis*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2002. 12(7): p. 317-324.
155. Kaikita K, Takeya M, Ogawa H, Suefuji H, Yasue H, Takahashi K. *Co-localization of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in coronary atherosclerosis*. Journal of Pathology, 1999. 188(2): p. 180-188.
156. Falkenberg M, Tjärnström J, Ortenwall P, Olausson M, Risberg B. *Localization of fibrinolytic activators and inhibitors in normal and atherosclerotic vessels*. Thrombosis and Haemostasis, 1996. 75(6): p. 933-938.
157. Smith EB, Staples M. *Haemostatic factors in human aortic intima*. Lancet, 1981. 1(8231): p. 1171-1174.
158. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nature Medicine, 2003. 9(1): p. 61-67.
159. Westrick RJ, Bodary PF, Xu Z, Shen YC, Broze GJ, Eitzman DT. *Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice*. Circulation, 2001. 103(25): p. 3044-3046.
160. Luttun A, Lupu F, Storkebaum E, Hoylaerts MF, Moons L, Crawley J, Bono F, Poole AR, Tipping P, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. *Lack of plasminogen activator inhibitor-1 promotes growth and abnormal matrix remodeling of advanced atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-deficient mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002. 22(3): p. 499-505.
161. Faber BC, Cleutjens KB, Niessen RL, Aarts PL, Boon W, Greenberg AS, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Daemen MJ. *Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques*. Circulation Research, 2001. 89(6): p. 547-554.
162. Bijnens AP, Gils A, Jutten B, Faber BC, Heeneman S, Kitslaar PJ, Tordoir JH, De Vries CJ, Kroon AA, Daemen MJ, Cleutjens KB. *Vasculin, a novel vascular protein differentially expressed in human atherogenesis*. Blood, 2003. 102(8): p. 2803-2810.
163. Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. *Acute coronary syndromes: Biology*. Lancet, 1999. 353(Suppl. 2): p. 5-9.
164. Corti R, Fuster V, Badimon JJ. *Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. 41(4 Suppl. 4).

165. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. *Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity*. *Circulation*, 2003. 107(7): p. 973-977.
166. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. *Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score*. *Circulation*, 2003. 108(2): p. 161-165.
167. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. *Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events*. *Circulation*, 2001. 103(4): p. 491-495.
168. Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. *Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men*. *Circulation*, 2002. 106(7): p. 820-825.
169. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. *Circulation*, 2000. 101(15): p. 1767-1772.
170. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. *Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction*. *Circulation*, 2000. 101(18): p. 2149-2153.
171. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ. *Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina*. *Circulation*, 2002. 106(1): p. 24-30.
172. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Van der Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. *New England Journal of Medicine*, 2003. 348(12): p. 1104-1111.
173. Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. *Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: An update*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999. 19(6): p. 1368-1377.
174. Blann AD, McCollum CN. *von Willebrand factor and soluble thrombomodulin as predictors of adverse events among subjects with peripheral or coronary atherosclerosis*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1999. 10(6): p. 375-380.
175. Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kubler W, Bode C. *Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease*. *Thrombosis and Haemostasis*, 1999. 82(Suppl. 1): p. 14-18.
176. Smilde TJ, Van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. *Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): A prospective, randomised, double-blind trial*. *Lancet*, 2001. 357(9256): p. 577-581.
177. Thøgersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G. *High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen*

- activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: Evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor.* *Circulation*, 1998. 98(21): p. 2241-2247.
178. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease.* *Circulation*, 2003. 107(12): p. 1579-1585.
179. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. *Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: The pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): A randomized trial and cohort study.* *Journal of the American Medical Association*, 2001. 286(1): p. 64-70.
180. Semb AG, Van Wissen S, Ueladn T, Smilde T, Waehre T, Tripp MD, Frøland SS, Kastelein JJ, Gullestad L, Pedersen TR, Aukrust P, Stalenhoef AF. *Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: Downregulatory effect of statin therapy.* *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. 41(2): p. 275-279.
181. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial.* *Lancet*, 2002. 360(9326): p. 7-22.
182. Hayden M, Pignone M, Phillips C, Mulrow C. *Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: A summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force.* *Annals of Internal Medicine*, 2002. 136(2): p. 161-172.
183. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. *AHA Scientific Statement: Guide to anticoagulant therapy: heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association.* *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2001. 21(7).
184. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation.* *New England Journal of Medicine*, 2001. 345(7): p. 494-502.
185. Yusuf S. *Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients.* *New England Journal of Medicine*, 2000. 342(3): p. 145-153.
186. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, Jones RH, Kereiakes D, Kupersmith J, Levin TN, Pepine CJ, Schaeffer JW, Smith III EE, Steward DE, Theroux P, Gibbons RJ, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Smith Jr SC. *ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-*

- segment elevation myocardial infarction - 2002: Summary article: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina)*. *Circulation*, 2002. 106(14): p. 1893-1900.
187. Morice MC, Serruys PW, Eduardo Sousa J, Fajadet J, Hayashi EB, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnàr F, Falotico R. *A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization*. *New England Journal of Medicine*, 2002. 346(23): p. 1773-1780.
 188. Corti R, Fuster V, Fayad ZA, Worthley SG, Helft G, Smith D, Weinberger J, Wentzel J, Mizsei G, Mercuri M, Badimon JJ. *Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions: Two years' follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging*. *Circulation*, 2002. 106(23): p. 2884-2887.
 189. Casper J. *Bosatige Geschwulste und Arteriosklerose*. *Z. Krebsforsch*, 1932. 36: p. 354-361.
 190. WHO, *Study Group on the classification of atherosclerotic lesions*. Technical Report Series, 1958: p. 143-147.
 191. Holman RL, Brown BW, Gore I, Mac Millan GC, Paterson JC, Pollack O, Roberts Jr JC, Wissler RW. *An index for the evaluation of arteriosclerotic lesions in the abdominal aorta. A report by the Committee on Lesions of the American Society for the Study of the Atherosclerosis*. *Circulation*, 1960. 28: p. 1137-1148.
 192. Giersten JC. *Atherosclerosis in an autopsy series. Chemical grading of atherosclerosis*. *Acta Path Microbio Scand.*, 1964. 170: p. 17-24.
 193. Stary HC, Chanler A, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1995. 15: p. 1512-1531.
 194. Farb A, Burke A, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. *Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death*. *Circulation*, 1996. 93: p. 1354-1363.
 195. Farb A, Tang AL, Burke AP, Sessums L, Liang Y, Virmani R. *Sudden coronary death: frequency of active coronary lesions, inactive coronary lesions, and myocardial infarction*. *Circulation*, 1995. 94: p. 3138-3145.

196. Burke AP, Farb A, Liang YH, Smialek J, Virmani R. *Effect of hypertension and cardiac hypertrophy on coronary artery morphology in sudden cardiac death.* Circulation, 1996. 94: p. 3138-3145.
197. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. *Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly.* N. Engl. J. Med., 1997. 336: p. 1276-1282.
198. Burke AP, Farb A, Kolodgie FD, Malcom GT, Virmani R. *Healed ruptured plaques are frequent in men with severe coronary disease and are associated with elevated total/high density lipoprotein (HDL) cholesterol.* Circulation, 1997. 96(Suppl. 1): p. 235.
199. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek J, Virmani R. *Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women.* Circulation, 1998. 97: p. 2110-2116.
200. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek JE, Virmani R. *Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease.* JAMA, 1999. 281: p. 921-926.
201. Gray-Weale AC, Graham JC, Burnett JR, Byme K, Lusby RJ. *Carotid artery atheroma :comparison of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology.* J Cardiovasc Surg, 1988. 29: p. 676-681.
202. Gerolaukos G, Ramaswami, Nicolaidis A. *Characterisation of symptomatic and asymptomatic plaques using high resolution real time ultrasonography.* Brit J Surg, 1993. 80: p. 1274-1277.
203. Pedro LM, Pedro MM, Gonçalves I, Carneiro TF, Balsinha C, Fernandes e Fernandes R, Fernandes e Fernandes J. *Atheroma plaque of the carotid bifurcation : how to identify an "active" lesion?* Rev Port Cardiol, 1999: p. 699-708.
204. Hellings WE, Peeters W, Moll FL, Pasterkamp G. *From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: The Search for Biomarkers of Plaque Destabilization.* Trends in Cardiovascular Medicine, 2007. 17(5): p. 162-171.
205. Polak JF, Shemanski L, O'Leary DH, Lefkowitz D, Price TR, Savage PJ, Brant WE, Reid C. *Hypoechoic plaque at US of the carotid artery: An independent risk factor for incident stroke in adults aged 65 years or older.* Radiology, 1998. 208(3): p. 649-654.
206. Rothwell PM, Gibson R, Warlow CP. *Interrelation between plaque surface morphology and degree of stenosis on carotid angiograms and the risk of ischemic stroke in patients with symptomatic carotid stenosis.* Stroke, 2000. 31(3): p. 615-621.

207. Biasi GM, Froio A, Diethrich EB, Deleo G, Galimberti S, Mingazzini P, Nicolaidis AN, Griffin M, Raithel D, Reid DB, Valsecchi MG. *Carotid plaque echolucency increases the risk of stroke in carotid stenting: The imaging in carotid angioplasty and risk of stroke (ICAROS) study*. *Circulation*, 2004. 110(6): p. 756-762.
208. Lovett JK, Redgrave JN, Rothwell PM. *A critical appraisal of the performance, reporting, and interpretation of studies comparing carotid plaque imaging with histology*. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2005. 36(5): p. 1091-1097.
209. Streifler JY, Eliasziw M, Fox AJ, Benavente OR, Hachinski VC, Ferguson GG, Barnett HJ. *Angiographic detection of carotid plaque ulceration: Comparison with surgical observations in a multicenter study*. *Stroke*, 1994. 25(6): p. 1130-1132.
210. Kessler C, Griewing B. *Ultrasound assessment of carotid plaque structure*. *JEMU*, 1996. 6: p. 357-360.
211. Nighoghossian N, Derex L, Douek P. *The Vulnerable Carotid Artery Plaque: Current Imaging Methods and New Perspectives*. 2005. p. 2764-2772.
212. Consensus Committee of the Ninth International Cerebral Hemodynamic Symposium. *Basic Identification Criteria of Doppler Microembolic Signals*. *Stroke*, 1995. 26: p. 1123-1126.
213. Geordadis D, Lindner A, Manz M, Sonntag M, Zunker P, Zerkoski R, Borggrefe M. *Intracranial microembolic signals in 500 patients with potential cardiac or carotid embolic source and in normal controls*. *Stroke*, 1997. 28: p. 1203-1207.
214. Pugsley W, Klinger I, Paschalis C, Aspey B, Newman S, Harrison M, Treasure T. *Microemboli and cerebral impairment during cardiac surgery*. *J Vasc Surg*, 1990. 24: p. 34-36.
215. Geordadis D, Grosset D, Kelman A, Faichney A, Lees Kr. *Prevalence and characteristics of intracranial microemboli signals in patents with different types of prosthetic cardiac valves*. *Stroke*, 1994. 25: p. 587-592.
216. Markus HS, Droste D, Brown M. *Detection of asymptomatic cerebral embolic signals with Doppler ultrasound*. *Lancet*, 1994. 343: p. 1011-1012.
217. Orlandi G, Parenti G, Bertolucci A, Murri L. *Silent Cerebral Microembolism in Asymptomatic and Symptomatic Carotid Artery stenosis*. *Eur Neurol*, 1997. 38: p. 39-43.
218. Ries S, Schminke U, Daffertshofer M, Hennerici M. *High intensity transient signals (HITS) in patients with carotid artery disease*. *Eur J Med Res*, 1996. 1(7): p. 328-330.

219. Siebler M, Kleinschmidt A, Sitzer M, Steinmetz H. *Cerebral microembolism in symptomatic and asymptomatic high grade internal carotid artery stenosis*. *Neurology*, 1994. 44: p. 615-618.
220. Nascet Investigators. *Clinical alert: benefit of carotid endarterectomy for patients with high-grade stenosis of the internal carotid artery*. *National Institute of Neurological Disorders and stroke, stroke and Trauma Division. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*. *Stroke*, 1991. 22: p. 816-817.
221. Edwards JH, Kricheff II, Riles T, Imparato A. *Angiographically undetected ulceration of the carotid bifurcation as a cause of embolic stroke*. *Radiology*, 1979. 132: p. 369-373.
222. Oliver TB, Lammie GA, Wright AR, Wardlaw J, Patel SG, Peek R, Ruckley CV, Collie DA. *Atherosclerotic plaque at the carotid bifurcation: CT angiographic appearance with histopathologic correlation*. *Am J Neuroradiology*, 1999. 20: p. 897-901.
223. Gortler M, Goldmann A, Mohr W, Widder B. *Tissue characterisation of atherosclerotic carotid plaque by MRI*. *Neuroradiology*, 1995. 37: p. 631-635.
224. Smith Jr, SC, Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, Grundy SM, Hiratzka L, Jones D, Krumholz HM, Mosca L, Pasternak RC, Pearson T, Pfeiffer MA, Taubert KA. *AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 Update - Endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute*. *Circulation*, 2006. 113(19): p. 2363-2372.
225. Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, Gorelick P, Halperin J, Harbaugh R, Johnston SC, Katzan I, Kelly-Hayes M, Kenton EJ, Marks M, Schwamm LH, Tomsick T. *Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association council on stroke - Co-sponsored by the council on cardiovascular radiology and intervention. The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline*. *Stroke*, 2006. 37(2): p. 577-617.
226. Bates, ER, Babb JD, Casey Jr DE, Cates CU, Duckwiler GR, Feldman TE, Gray WA, Ouriel K, Peterson ED, Rosenfield K, Rundback JH, Safian RD, Sloan MA, White CJ, Harrington RA, Abrams J, Anderson JL, Bates ER, Eisenberg MJ, Grines CL, Hlatky MA, Lichtenberg RC, Lindner JR, Pohost GM, Schofield RS, Shubrooks JR, Samuel J, Stein JH, Tracy CM, Vogel RA, Wesley DJ. *ACCF/SCAI/SVMB/SIR/ASITN 2007 Clinical Expert Consensus Document on Carotid Stenting: A Report of the American College of Cardiology Founda-*

- tion Task Force on Clinical Expert Consensus Documents (ACCF/SCAI/SVMB/SIR/ASITN Clinical Expert Consensus Document Committee on Carotid Stenting). *Journal of the American College of Cardiology*, 49(1): p. 126-170.
227. Elwin CE, Peterson B, Bloomstrand C, Olsson JE, Nilsson B, Von Arbin M, Britton M, Helmers C, Norrving B, Rosen A, Samuelsson K, Strandberg K, Wahlgren NG, Garde A, Carlsson A, Svensson J, Huitfeldt B, Lundberg PO, Wilhelmsen L. *Swedish Aspirin Low-dose Trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischaemic events*. *Lancet*, 1991. 338(8779): p. 1345-1349.
228. Farrel B, Godwin J, Richards S, Warlow C. *The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: Final results*. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1991. 54(12): p. 1044-1054.
229. Van Gijn J, Algra A, Kapelle J, Koudstaal PJ, Van Latum A. *A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke*. *New England Journal of Medicine*, 1991. 325(18): p. 1261-1266.
230. Taylor DW, Barnett HJ, Haynes RB, Ferguson GG, Sackett DL, Thorpe KE, Simard D, Silver FL, Hachinski V, Clagett GP, Barnes R, Spence JD. *Low-dose and high-dose acetylsalicylic acid for patients undergoing carotid endarterectomy: A randomised controlled trial*. *Lancet*, 1999. 353(9171): p. 2179-2184.
231. Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. *European stroke prevention study 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke*. *Journal of the Neurological Sciences*, 1996. 143(1-2): p. 1-13.
232. ESPRIT Study Group, Halkes PH, van Gijn J, Kapelle LJ, Koudstaal PJ, Algra A. *Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial*. *Lancet*, 2006. 367(9523): p. 1665-1673.
233. Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, Panak E, Roberts RS, Sicurella J, Turpie AG. *The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke*. *Lancet*, 1989. 1(8649): p. 1215-1220.
234. Hass WK, Easton JD, Adams Jr HP, Pryse-Phillips W, Molony BA, Anderson S, Kamm B. *A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients*. *New England Journal of Medicine*, 1989. 321(8): p. 501-507.
235. Gent M. *A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE)*. *Lancet*, 1996. 348(9038): p. 1329-1339.

236. Diener PH, Bogousslavsky PJ, Brass PL, Cimminiello PC, Csiba PL, Kaste PM, Leys PD, Matias-Guiu PJ, Rupprecht PH. *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): p. 331-337.
237. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaud L, Booth J, Topol EJ. *Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events*. *New England Journal of Medicine*, 2006. 354(16): p. 1706-1717.
238. Mohr JP, Thompson JL, Lazar RM, Levin B, Sacco RL, Furie KL, Kistler JP, Albers GW, Pettigrew LC, Adams Jr HP, Jackson CM, Pullicino P. *A comparison of warfarin and aspirin for the prevention of recurrent ischemic stroke*. *New England Journal of Medicine*, 2001. 345(20): p. 1444-1451.
239. Chimowitz MI, Kokkinos J, Strong J, Brown MB, Levine SR, Silliman S, Pessin MS, Weichel E, Sila CA, Furlan AJ, Kargman DE, Sacco RL, Wityk RJ, Ford G, Fayad PB. *The warfarin-aspirin symptomatic intracranial disease study*. *Neurology*, 1995. 45(8): p. 1488-1493.
240. Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. *Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. *Chest*, 2004. 126(Suppl. 3).
241. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R, Heart Protection Study Group. *Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20 536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions*. *Lancet*, 2004. 363(9411): p. 757-767.
242. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J. *Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): A multicentre randomised controlled trial*. *Lancet*, 2003. 361(9364): p. 1149-1158.
243. White HD, Simes RJ, Anderson NE, Hankey GJ, Watson JD, Hunt D, Colquhoun DM, Glasziou P, MacMahon S, Kirby AC, West MJ, Tonkin AM. *Pravastatin therapy and the risk of stroke*. *New England Journal of Medicine*, 2000. 343(5): p. 317-326.

244. Sillesen H. *Design and baseline characteristics of the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Study*. *Cerebrovascular Diseases*, 2003. 16(4): p. 389-395.
245. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan III A, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, Sillesen H, Simunovic L, Szrek M, Welch KM, Zivin JA. *High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack*. *New England Journal of Medicine*, 2006. 355(6): p. 549-559.
246. Lonn EM, Yusuf S, Dzavik V, Doris CI, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley WA, Teo KK. *Effects of Ramipril and vitamin E on atherosclerosis: The Study to Evaluate Carotid Ultrasound changes in patients treated with Ramipril and vitamin E (SECURE)*. *Circulation*, 2001. 103(7): p. 919-925.
247. MacMahon S, Neal B, Tzourio C, Rodgers A, Woodward M, Cutler J, Anderson C, Chalmers J, Ohkubo T, Bousser MG, Davis S, Donnan G, Hansson L, Harrap S, Lees KR, Liu L, Mancia G, Neal B, Omae T, Reid J, Rodgers A, Sega R, Terent A, Tzourio C, Warlow C, Woodward M, Anderson N, Bladin C, Chambers B, Gordon G, Sharpe N, Collins R, Sandercock P, Simes J, Sleight P, Brnabic A, Colman S, Francis L, Lee A, Gong L, Bousser MG, Yamaguchi T, Lees KR, William F, Deng Q, Hu DX, Wang W, Wu AL, Ma LY, Tao ZY, Biousse V, Berthet K, Ben Slamia L, Le Denmat C, Crespi S, Foglia G, Fujimoto C, Matsumura S, Marttala K, Pettersson M, Safwenberg M, Fenton J, Mcllvenna Y, Currie R, Bartram H, Briad J, Clague A, Cleverly Y, Cosson M, Culpan A, Douglas D, Flett S, Gray B, Holloway T, Milne A, Prasad R, Ratnasabapathy Y, Santos A, Wills M, Agnew T, Chapman N, Lewis N, Mullane B. *Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack*. *Lancet*, 2001. 358(9287): p. 1033-1041.
248. Lindholm LH, Ibsen H, Dhalof B, Devereux RB, Beevers G, De Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kistiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S. *Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomised trial against atenolol*. *Lancet*, 2002. 359(9311): p. 1004-1010.
249. Chiesa R, Zucca R, Garriboli L. *Cirugia de las Carótidas, en Surgical Sense*. 2000. p. 1-7.
250. The EC/IC Bypass Study Group. *Failure of extracranial-intracranial arterial bypass to reduce the risk of ischemic stroke: Results of an international randomized trial*. *New England Journal of Medicine*, 1985. 313(19): p. 1191-1200.

251. Chambers BR, Norris JW. *The case against surgery for asymptomatic carotid stenosis*. Stroke, 1984. 15(6): p. 964-967.
252. Taylor DW, Barnett HJ. *Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis*. New England Journal of Medicine, 1991. 325(7): p. 445-453.
253. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Ferguson GG, Haynes RB, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. *Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis*. New England Journal of Medicine, 1998. 339(20): p. 1415-1425.
254. Toole JF. *Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis*. Journal of the American Medical Association, 1995. 273(18): p. 1421-1428.
255. Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, Thomas D, MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. *Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: Randomised controlled trial*. Lancet, 2004. 363(9420): p. 1491-1502.
256. Dehaene I, D'Hooghe M, Joos F, Lanckneus M, Lecluyse A, Marchau M, Rocher A, Roussel J, Van Zandijke M, Dereume J, Hildebrand J, Ceusters W, De Reuck J, De Roose J, Decoo D, Derom D, Vakaet A, Carton H, Nevelsteen A. *MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis*. Lancet, 1991. 337(8752): p. 1235-1243.
257. Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F, Weiss DG, Messina L, Hershey LA, Colling C, Eskridge J, Deykin D, Winn HR. *Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in symptomatic carotid stenosis*. Journal of the American Medical Association, 1991. 266(23): p. 3289-3294.
258. Hobson II RW, Weiss DG, Fields WS, Coldstone J, Moore WS, Towne JB, Wright CB, Gage A, Haakenson C, Colling C, Rossos S, George A, Callow AD, Flora RE, Grotta JC, Imparato A, Crigler C, Beard W, Caesar SL. *Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis*. New England Journal of Medicine, 1993. 328(4): p. 221-227.
259. Tangkanakul C, Counsell CE, Warlow CP. *Local versus general anaesthesia in carotid endarterectomy: A systematic review of the evidence*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 1997. 13(5): p. 491-499.
260. Moore W, Quiñones-Baldrich W, Krupski WC. *Indications, Surgical Technique and Results for repair of Extracranial Occlusive Lesions*, in *Vascular Surgery*, R. B, Editor. 2000, Rutherford. p. 1789-1822.

261. Baker WH, Littooy FN, Hayes AC. *Carotid endarterectomy without a shunt: The control series*. Journal of Vascular Surgery, 1984. 1(1): p. 50-56.
262. Gnanadev DA, Wang N, Comunale FL, Reile DA. *Carotid artery stump pressure: how reliable is it in predicting the need for a shunt?* Annals of vascular surgery, 1989. 3(4): p. 313-317.
263. Schneider JR, Droste JS, Schindler N, Golan JF, Bernstein LP, Rosenberg RS. *Carotid endarterectomy with routine electroencephalography and selective shunting: Influence of contralateral internal carotid artery occlusion and utility in prevention of perioperative strokes*. Journal of Vascular Surgery, 2002. 35(6): p. 1114-1121.
264. Cao P, De Rango P, Zannetti S. *Eversion vs conventional carotid endarterectomy: A systematic review*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2002. 23(3): p. 195-201.
265. Counsell CE, Salinas R, Naylor R, Warlow CP. *A systematic review of the randomised trials of carotid patch angioplasty in carotid endarterectomy*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 1997. 13(4): p. 345-354.
266. Ouriel K, Green RM. *Clinical and technical factors influencing recurrent carotid stenosis and occlusion after endarterectomy*. Journal of Vascular Surgery, 1987. 5(5): p. 702-706.
267. Grego F, Antonello M, Lepidi S, Bonvini S, Deriu GP. *Prospective, randomized study of external jugular vein patch versus polytetrafluoroethylene patch during carotid endarterectomy: Perioperative and long-term results*. Journal of Vascular Surgery, 2003. 38(6): p. 1232-1240.
268. O'Hara PJ, Hertzner NR, Mascha EJ, Krajewski LP, Clair DG, Ouriel K. *A prospective, randomized study of saphenous vein patching versus synthetic patching during carotid endarterectomy*. Journal of Vascular Surgery, 2002. 35(2): p. 324-332.
269. Dotter CT, Judkins MP. *Transluminal treatment of arteriosclerosis obstruction: description of a new technique and a preliminary report of its applications*. Circulation, 1964. 30: p. 654-670.
270. Gruntzig A, Hopff H. *Perkitane rekanalitation chronischer arterieller verschlüsse mit einen neuen dilatations Katheter: modification des Dotter Technik*. Dtsch Med Wochenschr 1974. 99: p. 2502-2505.
271. Health and Public Policy Committee American College of Physicians. *Percutaneous transluminal angioplasty*. Ann Intern Med, 1983. 99: p. 864-869.
272. Mullan S, Duda EE, Patrona NJ. *Some examples of balloon technology in neurosurgery*. J Neurosurg, 1980. 52: p. 321-329.

273. Hasso AN, Bird CR, Winke DE, Thompson JR. *Fibromuscular dysplasia of the internal carotid artery: percutaneous transluminal angioplasty*. Am J Roentgenol, 1981. 136: p. 955-960.
274. Tievsky AL, Drury EM, Mardiat JG. *Transluminal angioplasty in postsurgical stenosis of the extracranial carotid artery*. Am J Neuroradiology, 1983. 4: p. 800-802.
275. Bachman DM, Dim RM. *Transluminal dilatation for subclavian steal syndrome*. Am J Roentgenol, 1980. 135: p. 995-996.
276. Brown MM. *Endovascular versus surgical treatment in patients with carotid stenosis in the Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study (CAVATAS): A randomised trial*. Lancet, 2001. 357(9270): p. 1729-1737.
277. Kastrup A, Groschel K, Krapf H, Brehm B, Dichgans J, Schulz JB. *Early outcome of Carotid Angioplasty and Stenting with and without cerebral protection Devices. A systematic review of the literature*. Stroke, 2003. **34**: p. 813-819.
278. Mas JL, Chatellier G, Beyssen B, EVA 3S investigators. *Carotid angioplasty and stenting with and without cerebral protection: clinical alert from the Endarterectomy versus angioplasty in patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis (EVA 3S) trial*. Stroke, 2004. 35: p. 8-20.
279. Théron J, Courthoux P, Henriot JP. *Angioplasty of supraortic arteries*. J Neuroradiol, 1984. 11: p. 187-200.
280. Albuquerque FC, Teitelbaum G, Lavine SD, Larsen DW. *Ballon-protected carotid angioplasty*. Neurosurgery, 2000. 46: p. 918-921.
281. Strecker EP, Hagen B, Liermann D, Boos I, Kuhn FP, Reifart N, Theron J. *Current status of the Strecker Stent*. Cardiol Clin, 1994. 12: p. 673-687.
282. Diethrich EB, Gordon MH, Lopez Galarza LA, Rodríguez-López JA, Fernando Casses. *Intraluminal Palmaz stent implantation for treatment of recurrent carotid artery occlusive disease: a plan for the future*. J Intervent Cardiol, 1995. 8: p. 213-218.
283. Dietz A, Berkefeld J, Theron J, Schmitz Rixen T. *Endovascular treatment of symptomatic carotid Stenosis using stent placement. Long term follow-up of patients with a balanced surgical risk benefit ratio*. Stroke, 2001. 32: p. 1855-1859.
284. Brown MM, Venables G, Clifton A, Gaines P, Taylor RS. *Carotid endarterectomy vs carotid angioplasty*. Lancet, 1997. 349: p. 880-881.
285. Phatouros CC, Higashida FR, Malek A, Meyers PM, Lempert TE, Dowd CF, Halbach VV. *Carotid artery Stent placement for Atherosclerotic disease: Rationale, Technique, and Current Status*. Radiology, 2000. 217: p. 26-41.

286. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whittemore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, Caplan LR, Kresowik TF, Matchar DB, Toole JF, Easton JD, Adamas Jr HP, Brass LM, Hobson II RW, Brott TG, Sternau L. *Guidelines for carotid endarterectomy: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the stroke council, American Heart Association*. *Circulation*, 1998. 97(5): p. 501-509.
287. Blacker DJ, Flemming KD, Link MJ, Brown Jr RD. *The Preoperative Cerebrovascular Consultation: Common Cerebrovascular Questions before General or Cardiac Surgery*. *Mayo Clinic Proceedings*, 2004. 79(2): p. 223-229.
288. Hobson RW, Howard VJ, Roubin GS,, Brott TG, Ferguson RD, Popma JJ, Graham DL, Howard G, CREST Investigators. *Carotid artery stenting is associated with increased complications in octogenarians: 30-day stroke and death rates in the CREST lead-in phase*. *J Vasc Surg*, 2004. 40: p. 1106-1111.
289. Safian RD, Bresnahan J, Jaff MR, Foster M, Bacharach JM, Maini B, Turco M, Myla S, Eles G, Ansel GM, CREATE Pivotal Trial Investigators. *Protected carotid stenting in high-risk patients with severe carotid artery stenosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47: p. 2384-2389.
290. Bond R, Rerkasem K, Rothwell PM. *Systematic review of the risks of carotid endarterectomy in relation to the clinical indication for and timing of surgery*. *Stroke*, 2003. 34(9): p. 2290-2301.
291. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Warlow CP, Barnett HJ. *Endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to clinical subgroups and timing of surgery*. *Lancet*, 2004. 363: p. 915-924.
292. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage

- T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. *The sequence of the human genome*. Science, 2001. 291: p. 1304-1351.
293. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Phillipson P, Tettelin H, Oliver SG. *Life with 6000 genes*. Science, 1996. 274: p. 563-567.
294. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gre-

- gory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. *Nature*, 2002. **420**: p. 520-562.
295. Anderson L, Seihamer J. *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. *Electrophoresis*, 1997. **18**: p. 533-537.
296. Paulson L, Martin P, Persson A, Nilsson CL, Ljung E, Westman-Brinkmalm A, Eriksson PS, Blennow K, Davidsson P. *Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats*. *J Neurosci Res*, 2003. **71**: p. 526-533.
297. Hanash S. *Disease proteomics*. *Nature*, 2003. **422**: p. 226-232.
298. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJ, Desjardins M. *Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages*. *Cell*, 2002. **110**: p. 119-131.
299. Wasinger VC, Cordwell S, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith. *Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995. **16**: p. 1090-1094.

300. Lau AT, He QY, Chiu JF. *Proteomic technology and its biomedical applications*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shangai), 2003. 35: p. 965-975.
301. O'Farrel PH. *High resolution two dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. 250: p. 4007-4021.
302. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev 1996. 13: p. 19-50.
303. Anderson NG, Anderson NL. *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis, 1998. 19: p. 1853-1861.
304. Blackstock WP, Weir MP. *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*. Trends Biotechnol, 1999. 17: p. 121-127.
305. Dunn MJ. *Studying heart disease using the proteomic approach*. Drug Discov Today, 2000. 5: p. 76-84.
306. Hochstrasser DF. *Proteome in perspective*. Clin Chem Lab Med, 1998. 36: p. 825-836.
307. Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G, Stoffler G. *Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases*. Electrophoresis, 1999. 20: p. 2100-2110.
308. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. *Isoelectric focusing in immobilized ph gradients: Principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 1982. 6: p. 317-339.
309. Görg A, Postel W, Domscheit A, Günther S. *Twodimensional electrophoresis with immobilized ph gradients of leaf proteins from barley (hordeum vulgare): Method, reproducibility and genetic aspects*. Electrophoresis, 1988. 9: p. 681-692.
310. Rabilloud T, Brodard V, Peltre G, Righetti PG, Ettori C. *Modified silver staining for immobilized ph gradients*. Electrophoresis, 1992. 13: p. 264-266.
311. Patton WF. *A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two dimensional gel electrophoresis and proteomics*. Electrophoresis, 2000. 21: p. 1123-1144.
312. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 1997. 18: p. 2071-2077.
313. Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Zhao Y, *2D differen-*

- tial in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers.* Mol Cell Proteomics, 2002. 1: p. 117-124.
314. Gharbi S, Gaffney P, Yang A, Zvelebil MJ, Cramer R, Waterfield MD, Timms JF. *Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system.* Mol Cell Proteomics, 2002. 1: p. 91-98.
315. Govorun VM, Archakov A. *Proteomic technologies in modern biomedical science.* Biochemistry, 2002. 67: p. 1109-1123.
316. Griffiths W, Jonson P, Liu S, Rai K, Wang Y. *Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry.* Biochem J, 2001. 355: p. 545-561.
317. Washburn MP, Yates J. *New methods of proteome analysis: multidimensional chromatography and mass spectrometry,* in *Proteomics: A Trend Guide.* 2000. p. 27-30.
318. Stahl D, Lee T. *Data controlled microscale liquid chromatography-tandem mass spectrometry of peptides and proteins: strategies for improved sensitivity, efficiency and effectiveness,* en *Proteome Research: Mass spectrometry.* JamesP, Editor. Springer: Berlin, 2001. p. 55-73.
319. Gigy SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.* Nat Biotechnol, 1999. 17: p. 994-999.
320. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M. *Global analysis of protein activities using proteome chips.* Science, 2001. 293: p. 2101-2105.
321. Hale JE, Gelfanove V, Ludwig JR, Knierman MD. *Application of proteomics for discover of protein biomarkers.* Brief Funct Genomic Proteomic, 2003. 2: p. 185-193.
322. Dhodda VK, Sailo KA, Bowen KK, Vemuganti R. *Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis.* J Neurochem, 2004. 89: p. 73-89.
323. Colantonio DA, Chan DW. *The clinical application of proteomics.* Clin Chim Acta, 2005. 357: p. 151-158.
324. Alaiya AA, Franzen B, Auaer G, Linder S. *Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning model for tumor classification.* Electrophoresis, 2000. 21: p. 1210-1217.
325. Brea D, Cristobo I, Sobrino T, Rodríguez-González R, Mosquera E, Moldes O, Castillo J. *Aplicación de la proteómica a las enfermedades neurológicas.* Neurologia, 2007. 22: p. 170-179.

326. Sironi L, Tremoli E, Miller I, Guerrini U, Calvio AM, Eberini I, Gemeiner M, Ascende M, Paoletti R, Gianazza E. *Acute-phase proteins before cerebral ischemia in stroke-prone rats*. Stroke, 2001. 32: p. 753-760.
327. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Vivanco F, Michel JB, Meilhac O, Egido J. *Biology of atherosclerotic plaques what we are learning from proteomic analysis*. Cardiovasc Res, 2006. 72: p. 18-29.
328. Donners MP, Verluyten MJ, Bouwman FG, Mariman EC, Devreese B, Vanrobaeys F, Van Beeumen J, Van den Akker LH, Daemen MJ, Heeneman S. *Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression*. J Pathol, 2005. 206: p. 39-45.
329. Di Napoli M, Papa F, Bocola V. *Prognostic influence of increased c-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke*. Stroke, 2001. 32: p. 133-138.
330. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F, Centers for Disease Control and Prevention, American Heart Association. *Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association*. Circulation, 2003. 107: p. 499-511.
331. Ramagli LS, Rodríguez LV. *Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer*. Electrophoresis, 1985. 6: p. 559-563.
332. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamide gels*. Anal. Chem, 1996. 68: p. 850-858.
333. García-González M, Abdulkader I, Boquete A, Neo X, Forteza J, Cameselle-Teijeiro J. *Cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic follicular cells of the human thyroid gland*. Virchows Archiv, 2005. 447(1): p. 12-17.
334. Lopez AD, Mathers CD, Ezati M, Jamison DT, Murray CJ. *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. The Lancet. 367(9524): p. 1747-1757.
335. Lee RT, Libby P. *The Unstable Atheroma*. 1997. p. 1859-1867.
336. Spagnoli LG, Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, Bonnano E, Schwartz RS, Piegras DG, Pistolesse R, Ippoliti A, Holmes Jr DR. *Extracranial Thrombotically Active Carotid Plaque as a Risk Factor for Ischemic Stroke*. JAMA, 2004. 292: p. 1845-1852.
337. Vink A, Schoneveld AH, Poppen M, de Kleijn DP, Borst C, Pasterkamp G. *Morphometric and immunohistochemical characterization of the intimal*

- layer throughout the arterial system of elderly humans. *J Anat*, 2002. 200 (1): p. 97-103.
338. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. *Coronary Plaque Erosion Without Rupture Into a Lipid Core : A Frequent Cause of Coronary Thrombosis in Sudden Coronary Death*. *Circulation*, 1996. 93: p. 1354-1363.
339. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. *Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death : Evidence That Sub-clinical Rupture Has a Role in Plaque Progression*. *Circulation*, 2001. 103: p. 934-940.
340. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. *From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I*. *Circulation*, 2003. 108: p. 1664-1672.
341. Haverkate E, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Group MB. *Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina*. *The Lancet*, 1997. 349(9050): p. 462-466.
342. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P, Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering Investigators. *Statin Therapy, LDL Cholesterol, C-Reactive Protein, and Coronary Artery Disease*. *N Eng J Med*, 2005. 352: p. 29-38.
343. Vivanco F, Martín-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco-Colio L, Darde VM, Mas S, Meilhac O, Michel JB, Tunon J, Egido J. *Quest for Novel Cardiovascular Biomarkers by Proteomic Analysis*. *J Proteom Res*, 2005. 4(4): p. 1181-1191.
344. Atkins MD, Bush RL. *Embollic Protection Devices for Carotid Artery Stenting: Have They Made a Significant Difference in Outcomes*. *Sem Vasc Surg*, 2007. 20(4): p. 244-251.
345. Angelini A, Reimers B, Barbera MD, Sacca S, Pasquetto G, Cernetti C, Valente M, Pascotto P, Thiene G. *Cerebral Protection During Carotid Artery*

- Stenting: Collection and Histopathologic Analysis of Embolized Debris*. Stroke, 2002. 33: p. 456-461.
346. DeRubertis BG, Chaer RA, Gordon R, Bell H, Hyneczek RL, Pieracci FM, Karwowski J, Kent KG, Faries PL. *Determining the quantity and character of carotid artery embolic debris by electron microscopy and energy dispersive spectroscopy*. J Vasc Surg, 2007. 45(4): p. 716-725.
347. Mayr M, Zhang J, Greene AS, Gutterman D, Perloff J, Ping P. *Proteomics-based Development of Biomarkers in Cardiovascular Disease: Mechanistic, Clinical, and Therapeutic Insights*. Mol Cell Prot, 2006. 5: p. 1853-1864.
348. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang S, Zebroski H, Claffey KP, Haudenschild C, Eng JK, Lundgren DH, Han DK. *Proteomics Analysis of Human Coronary Atherosclerotic Plaque: A Feasibility Study of Direct Tissue Proteomics by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry*. Mol Cell Prot, 2007. 6: p. 1088-1102.
349. Mayr M, Chung YL, Mayr U, Yin X, Ly L, Troy H, Fredericks S, Hu Y, Griffiths JR, Xu Q. *Proteomic and Metabolomic Analyses of Atherosclerotic Vessels From Apolipoprotein E-Deficient Mice Reveal Alterations in Inflammation, Oxidative Stress, and Energy Metabolism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25: p. 2135-2142.
350. Hansson GK, Heistad DD. *Two Views on Plaque Rupture*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27: p. 697.
351. Duran MC, Mas S, Martín-Ventura JL, Meihac O, Michel JB, Gallego-Delgado J, Lázaro A, Tuñón J, Egido J, Vivanco F. *Proteomic analysis of human vessels: Application to atherosclerotic plaques*. Proteomics, 2003. 3 (6): p. 973-978.
352. van Heerde WL, Lap P, Schoormans S, de Groot PG, Reutelingsperger CP, Vroom TM. *Localization of Annexin A5 in Human Tissues*. Annexins, 2004. 1(1): p. 37-43.
353. Cederholm A, Frostegard J. *Annexin A5 as a Novel Player in Prevention of Atherothrombosis in SLE and in the General Population*. Ann NY Acad Sci, 2007. 1108: p. 96-103.
354. Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. *Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications*. J Nucl Med, 2005. 46(12): p. 2035-2050.
355. Munoz LE, Fey B, Pausch F, Baum W, Mueller RB, Brachvogel B, Poschl E, Rodel F, von der Mark K, Herrmann M, Gaipf UD. *The Role of Annexin A5 in the Modulation of the Immune Response Against Dying and Dead Cells*. Curr Med Chem, 2007. 14: p. 271-277.

356. Gabr A, Reed M, Newman D, Pohl J, Khosla J, Sannes P. *Alterations in cytoskeletal and immune function-related proteome profiles in whole rat lung following intratracheal instillation of heparin*. *Resp Res*, 2007. 8: p. 36.
357. Matsuda R, Kaneko N, Kikuchi M, Chiwari F, Toda M, Leiri T, Horikawa Y, Shimizu M, Shimamoto K. *Clinical significance of measurement of plasma annexin V concentration of patients in the emergency room*. *Resuscitation*, 2003. 57(2): p. 171-177.
358. van Tits LJ, van Heerde WL, van der Vleuten GM, de Graaf J, Grobbee DE, van de Vijver LP, Stalenhoef AF, Princen HM. *Plasma annexin A5 level relates inversely to the severity of coronary stenosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 356(3): p. 674-680.
359. Roberts EL, Newton RP, Axford AT. *Plasma purine nucleoside phosphorylase in cancer patients*. *Clin Chim Acta*, 2004. 344(1-2): p. 109-114.
360. Nyhan WL. *Disorders of purine and pyrimidine metabolism*. *Mol Genet Metabol*, 2005. 86(1-2): p. 25-33.
361. Robertson JG. *Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. 17(6): p. 674-679.
362. Verheyen AK, Vlamincx EM, Lauwers FM, Saint-Guillain ML, Borgers MJ. *Identification of macrophages in intimal thickening of rat carotid arteries by cytochemical localization of purine nucleoside phosphorylase*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1988. 8: p. 759-767.
363. Rao PN, Walsh TR, Makowka L, Rubin RS, Weber T, Snyder JT, Starzl TE. *Purine nucleoside phosphorylase: A new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell*. *Hepatology*, 1990. 11: p. 193-198.
364. Mundt JM, Hah SS, Sumbad RA, Schramm V, Henderson PT. *Incorporation of extracellular 8-oxodG into DNA and RNA requires purine nucleoside phosphorylase in MCF-7 cells*. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(1): p.228-236.
365. Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, QuinnMT, Lambeth JD, Griendling KK. *Upregulation of Nox-Based NAD(P)H Oxidases in Restenosis After Carotid Injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22: p. 21-27.
366. Gez S, Crossett B, Christopherson RI. *Differentially expressed cytosolic proteins in human leukemia and lymphoma cell lines correlate with lineages and functions*. *Biochim Biophys Acta - Proteins & Proteomics*, 2007. 1774(9): p. 1173-1183.
367. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T. *Elevated Fluid Shear Stress Enhances Postocclusive Collateral Artery Growth and Gene Expression in the Pig Hind Limb*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24: p. 1664-1668.

368. Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meihac O, Leclercq A, Michel JB, Jensen ON, Hernandez-Merida S, Tunon J, Vivanco F, Egido J. *Identification by a Differential Proteomic Approach of Heat Shock Protein 27 as a Potential Marker of Atherosclerosis*. *Circulation*, 2004. 110: p. 2216-2219.
369. Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquié SM, Hefta SA, Opitck GJ. *In Vitro Biomarker Discovery for Atherosclerosis by Proteomics*. *Mol Cell Prot*, 2004. 3: p. 1200-1210.
370. Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B, Guillouzo A. *Gene and Protein Characterization of the Human Glutathione S-Transferase Kappa and Evidence for a Peroxisomal Localization*. *J Biol Chem*, 2004. 279(16): p. 16246-16253.
371. Bonomini F, tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. *Atherosclerosis and oxidative stress*. *Histol Histopathol*, 2008. 23: p. 381-390.
372. Hoen PA, Van del Lans CA, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJ, Twisk J. *Aorta of ApoE-Deficient Mice Responds to Atherogenic Stimuli by a Preleisional Increase and Subsequent Decrease in the Expression of Antioxidant Enzymes*. *Circ Res*, 2003. 93: p. 262-269.
373. Yang Y, Yang Y, Trent MB, He N, Lick SD, Zimniak P, Awasthi YC, Boor PJ. *Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2004. 173(2): p. 211-221.
374. Manfredi S, Federici C, Picano E, Botto N, Rizza A, Andreassi MG. *GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: A case-only study*. *Mut Res*, 2007. 621(1-2): p. 106-112.
375. Fujita T, Suzuki K, Tada T, Yoshihara Y, Hamaoka R, Uchida K, Matuo Y, Sasaki T, Hanafusa T, Taniguchi N. *Human Erythrocyte Bisphosphoglycerate Mutase: Inactivation by Glycation In Vivo and In Vitro*. *J Biochem*, 1998. 124(6): p. 1237-1244.
376. Lin Hl, Xu XS, Lu HX, Zhang L, Li C, Tang M, Sun H, Liu Y, Zhang Y. *Pathological mechanisms and dose dependency of erythrocyte-induced vulnerability of atherosclerotic plaques*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 43(3): p. 272-280.
377. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. *The ubiquitin-proteasome system*. *J Biosci*, 2006. 31(1): p. 137-155.
378. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. *Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis*. *FASEB*, 2000. 14: p. 532-542.

379. Bamm VV, Tsemakhovich VA, Shaklai M, Shaklai N. *Haptoglobin Phenotypes Differ in Their Ability To Inhibit Heme Transfer from Hemoglobin to LDL*. *Biochem*, 2004. 43(13): p. 3899-3906.
380. Levy AP, Levy JE, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy N, Asaf R, Guetta J, Yang C, Purushothaman KR, Fuster V, Moreno PR. *Haptoglobin Genotype Is a Determinant of Iron, Lipid Peroxidation, and Macrophage Accumulation in the Atherosclerotic Plaque*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27: p. 134-140.
381. Kovanen PT. *Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis*. *Immunol Rev*, 2007. 217(1): p. 105-122.
382. Nabata A, Kuroki M, Ueba H, Hashimoto S, Umemoto T, Wada H, Yasu T, Saito M, Momomura SI, Kawakami M. *C-reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrix metalloproteinase-9 production in human mononuclear cells: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque*. *Atherosclerosis*, 2008. 196(1): p. 129-135.
383. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Maruyama I. *HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques*. *Cardiovas Pathol*, 2007. 16(3): p. 136-143.
384. Clarke, M, Bennett M. *The Emerging Role of Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis in Atherosclerosis and Plaque Stability*. *Am J Nephrol*, 2006. 26(6): p. 531-535.
385. Jain RK, Finn AV, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R. *Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, 2007. 4(9): p. 491-502.