

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 443**

51 Int. Cl.:

A61B 6/03 (2006.01)

A61B 6/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2015 PCT/GB2015/052359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16024128**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015 E 15753743 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3179917**

54 Título: **Método para la caracterización de tejido perivascular**

30 Prioridad:

15.08.2014 GB 201414496

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.07.2019

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**ANTONIADES, CHARALAMBOS;
ANTONOPOULOS, ALEXIOS;
NEUBAUER, STEFAN y
CHANNON, KEITH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 443 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la caracterización de tejido perivascular

Campo de la invención

La presente invención se refiere a tejido perivascular y a métodos para su caracterización.

5 Antecedentes de la invención

El tejido adiposo perivascular (PVAT, por sus siglas en inglés) rodea las arterias (coronarias) y puede estar implicado en la estimulación local de la formación de placa aterosclerótica. El PVAT se puede cuantificar usando una variedad de técnicas incluyendo, por ejemplo, la ecocardiografía, la tomografía computarizada (TC) y la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). La cantidad de PVAT se correlaciona con algunos parámetros de un síndrome metabólico, incluyendo el aumento del perímetro de la cintura, hipertrigliceridemia e hiperglicemia, y con la aterosclerosis coronaria. Se sabe desde hace tiempo que el PVAT secreta proteínas proinflamatorias e induce la inflamación de la pared arterial. La premisa sostenida desde hace tiempo era que la patología de la aterogénesis en la pared vascular estaba estimulada externamente, y se sugirió que el PVAT tenía un papel clave en ese proceso.

La aterosclerosis es un proceso progresivo en el que una pared arterial se vuelve más gruesa como consecuencia de una invasión y acumulación de glóbulos blancos de la sangre. Este proceso inflamatorio da lugar a placas dentro de la pared del vaso que contienen glóbulos blancos sanguíneos vivos, restos de células muertas y depósitos de grasa incluyendo colesterol y triglicéridos.

Las placas ateroscleróticas estables, que tienden a ser asintomáticas, normalmente son ricas en matriz extracelular y células del músculo liso, mientras que las placas inestables son ricas en macrófagos y células espumosas y la matriz extracelular que separa la lesión del lumen arterial (también conocida como la capa fibrosa) es por lo general débil y propensa a la ruptura. Las rupturas de la capa fibrosa inducen, eventualmente, a una formación de coágulos en el lumen y tales coágulos pueden bloquear las arterias o desprenderse, llegando a la circulación sanguínea y eventualmente bloquear vasos más pequeños aguas abajo, causando tromboembolismo. Las placas en expansión crónica son frecuentemente asintomáticas hasta que la oclusión del vaso (estenosis) es lo suficientemente grave que el suministro de sangre al tejido aguas abajo es insuficiente. La aterosclerosis es asintomática durante décadas debido a que las arterias se agrandan en todos los lugares de placa y el flujo sanguíneo no se ve afectado inmediatamente. De hecho, las roturas de la placa también son asintomáticas, a menos que den lugar a un estrechamiento suficiente o al cierre de una arteria que impida el flujo sanguíneo a diferentes órganos, de modo que se inducen los síntomas. Normalmente, la enfermedad se diagnostica solo cuando el paciente experimenta otros trastornos cardiovasculares, tales como accidente cerebrovascular o ataque cardíaco. La aterosclerosis sintomática se asocia normalmente con hombres de 40 años y mujeres de 50 a 60 años. De forma subclínica, la enfermedad comienza a aparecer en la niñez, y los signos perceptibles pueden comenzar a desarrollarse en la pubertad. Aunque la enfermedad de las arterias coronarias es más frecuente en los hombres que en las mujeres, la aterosclerosis de las arterias cerebrales y los accidentes cerebrovasculares afectan por igual a ambos sexos.

La aterosclerosis puede causar un estrechamiento en las arterias coronarias, que son responsables de llevar sangre oxigenada al corazón, y esto puede producir síntomas tales como el dolor en el pecho de la angina de pecho, dificultad respiratoria, sudoración, náuseas, mareos o desvanecimientos, disnea o palpitaciones. Las arritmias cardíacas también pueden ser el resultado de una isquemia cardíaca. La aterosclerosis que causa un estrechamiento en las arterias carótidas, que suministran sangre al cerebro y al cuello, puede producir síntomas tales como sensación de debilidad, no ser capaz de pensar con claridad, dificultad para hablar, convirtiéndose en mareos y dificultad para caminar o estar de pie derecho, visión borrosa, entumecimiento de la cara, los brazos y las piernas, dolor de cabeza grave y pérdida de conocimiento. Estos síntomas también pueden estar presentes en el accidente cerebrovascular, que se debe a un estrechamiento marcado o al cierre de las arterias que van al cerebro, lo que conduce a una isquemia cerebral y muerte de las células en el cerebro. Las arterias periféricas, que suministran sangre a las piernas, los brazos y la pelvis también pueden verse afectadas. Los síntomas pueden incluir entumecimiento en las extremidades afectadas, así como dolor. La formación de placas también puede ocurrir en las arterias renales, que suministran sangre a los riñones. La incidencia y la acumulación de placas conducen a una disminución del flujo sanguíneo renal y a una enfermedad renal crónica que, como en todas las demás áreas, es normalmente asintomática hasta los estadios finales.

La inflamación es fundamental en la aterogénesis (Ross R (1999). Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2): 115-26; y Major AS, y Harrison DG (2011). What fans the fire: insights into mechanisms of inflammation in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Circulation* 124(25):2809-11) y las modalidades que puedan detectar con precisión una inflamación vascular en un estadio temprano permitirían una mejor estratificación del riesgo cardiovascular y la ejecución de intervenciones terapéuticas apropiadas. Las herramientas actuales para evaluar una inflamación vascular que se basan en biomarcadores plasmáticos sistémicos (por ejemplo, la proteína C reactiva, citocinas proinflamatorias) no están relacionadas directamente con el proceso de la aterogénesis (Weintraub WS, y Harrison DG (2000). C-reactive protein, inflammation and atherosclerosis: do we really understand it yet? *Eur Heart J* 21(12):958-60), y proporcionan asociaciones muy débiles con procesos vasculares biológicos locales (Lee R, Marga-

ritis M, Channon KM, y Antoniades C (2012). Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Current medicinal chemistry* 19(16):2504-20; y Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, Shirodaria C, Sayeed R, Petrou M, De Silva R, et al. (2013). Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation* 127(22):2209-21). Además, las herramientas de formación de imágenes existentes (invasivas tales como ultrasonidos intravasculares / tomografía de coherencia óptica, o no invasivas tales como Angiografía por Tomografía Computarizada (CT) / tomografía de emisión de positrón fluorodesoxiglucosa (18F)) son incapaces de proporcionar una información fiable sobre la inflamación vascular en las arterias coronarias humanas (Fifer KM, Qadir S, Subramanian S, Vijayakumar J, Figueroa AL, Truong QA, Hoffmann U, Brady TJ y Tawakol A (2011). Positron emission tomography measurement of periodontal 18F-fluorodeoxyglucose uptake is associated with histologically determined carotid plaque inflammation. *Journal of the American College of Cardiology* 57(8):971-6). La puntuación del calcio coronario (CCS) es el único biomarcador de formación de imágenes no invasivo con un valor predictivo en la prevención primaria (Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM y Detrano RC (2004). Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *Jama* 291(2):210-5), pero describe cambios estructurales no reversibles de la pared vascular, y no se altera por intervenciones que reducen el riesgo cardiovascular (por ejemplo, estatinas) (Alexopoulos N, Melek BH, Arepalli CD, Hartlage GR, Chen Z, Kim S, Stillman AE y Raggi P (2013). Effect of intensive versus moderate lipid-lowering therapy on epicardial adipose tissue in hyperlipidemic post-menopausal women: a substudy of the BELLES trial (Beyond Endorsed Lipid Lowering with EBT Scanning). *Journal of the American College of Cardiology* 61(19):1956-61). Un nuevo biomarcador de la formación de imágenes que pudiera superar estas limitaciones y detectar una inflamación vascular de forma no invasiva, sería muy valioso en la investigación clínica y la estratificación de un riesgo de enfermedad arterial coronaria (Hoefer IE, Steffens S, Ala-Korpela M, Back M, Badimon L, Bochaton-Piallat ML, Boulanger CM, Caligiuri G, Dimmeler S, Egido J, et al. (2015). Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. *Eur Heart J* 2015 Jun 5. pii: ehv236[Epub ahead of print]).

Recientemente ha quedado claro que una inflamación vascular y el estrés oxidativo tienen la capacidad de afectar a la biología del PVAT ya que la pared vascular libera mediadores capaces de ejercer un efecto paracrino sobre el PVAT vecino (véase, por ejemplo Margaritis et al. *Circulation* 2013; 127(22):2209-21). Esta observación contrastaba con la teoría clásica, según la cual el PVAT envía señales paracrinas a la pared vascular. Ahora se entiende que la biología del PVAT está conformada por señales recibidas desde el vaso sanguíneo que lo rodea, y la caracterización de ese PVAT puede proporcionar una información útil sobre la biología y la salud de ese vaso sanguíneo.

El tejido adiposo libera una amplia gama de moléculas bioactivas que ejercen efectos endocrinos y paracrinos sobre la pared vascular (Antoniades C, Antonopoulos AS, Tousoulis D y Stefanadis C (2009). Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 10(3):269-79), pero recientemente se ha sugerido que la comunicación entre el tejido adiposo y la pared vascular es bidireccional (Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, Shirodaria C, Sayeed R, Petrou M, De Silva R, et al. (2013). *Circulation* 127(22):2209-21; y Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, Shirodaria C, Psarros C, Herdman L, Sanna F, De Silva R, Petrou M, Sayeed R, et al. (2015). Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes* 64(6):2207-19). Las propiedades biológicas del tejido adiposo están reguladas en gran parte por el grado de diferenciación de los pequeños preadipocitos inmaduros a adipocitos grandes, bien diferenciados, ricos en gotitas intracelulares de lípidos (Ntambi JM, y Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition* 130(12):3122S-6S). Esta diferenciación de preadipocitos está orquestada por la activación de PPAR- γ , un factor de transcripción suprimido por una inflamación exógena (Bassols J, Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Peral B, Ricart W, y Fernandez-Real JM (2009). Study of the proinflammatory role of human differentiated omental adipocytes. *Journal of cellular biochemistry* 107(6):1107-17). No existe ningún método no invasivo establecido para realizar un seguimiento del tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo humano.

Los esfuerzos previos para analizar la cantidad de depósitos de tejido adiposo humano mediante tomografía computarizada han producido solo unos datos limitados sobre la evaluación de la calidad del PVAT mediante la formación de imágenes. Se ha descrito uno de tales intentos de evaluar la "calidad" del tejido adiposo pericoronario (Konishi et al. *Atherosclerosis* 2011). En ese estudio, la "densidad del tejido adiposo" se cuantificó en áreas de 10 mm² seleccionadas arbitrariamente en imágenes 2D de TC, y se definió un gradiente de TC pericoronario (PDG) usando valores de radiodensidad determinados para el PVAT, definido arbitrariamente como el que está hasta a 5 mm de la pared de la arteria coronaria, para el tejido adiposo no perivascular (no PVAT), definido arbitrariamente como el que está a más de 10 mm de la pared de la arteria coronaria. Este enfoque sigue siendo uno cuantitativo que es propenso a un sesgo subjetivo, como lo hace el depender del criterio del individuo que analiza los datos de la imagen del TC para seleccionar las regiones apropiadas para el análisis.

A pesar de la alta incidencia y de la naturaleza asintomática de gran parte de la enfermedad vascular, sigue existiendo una necesidad urgente de una herramienta que permita una caracterización objetiva, no invasiva del PVAT. Las técnicas disponibles proporcionan una información acerca de la cantidad de PVAT que rodea un vaso sanguíneo, pero este dato no caracteriza al PVAT medido y no puede distinguir entre las patologías. Por lo tanto, existe una necesidad de una herramienta específica y sensible para caracterizar con precisión el PVAT alrededor de un vaso sanguíneo.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de los inventores de que la inflamación vascular y el estrés oxidativo tienen la capacidad de afectar a la biología del PVAT, ya que la pared vascular libera mediadores capaces de ejercer un efecto paracrino sobre el PVAT vecino. La presente invención proporciona métodos para la caracterización volumétrica del tejido perivascul ar usando datos recogidos a partir de una exploración por tomografía computarizada, y también proporciona el uso de tales métodos en la identificación y el diagnóstico de una enfermedad vascular. Los métodos proporcionados por la invención no dependen del volumen del PVAT y por lo tanto son menos propensos a factores de confusión relacionados con la expansión del tejido adiposo y, teniendo en cuenta el diámetro del vaso, permiten una detección de cambios tempranos en el PVAT que pueden preceder al desarrollo de una enfermedad vascular.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un método para la caracterización volumétrica del tejido perivascul ar utilizando datos recogidos a partir de una exploración por tomografía computarizada (TC) a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, comprendiendo el método: cuantificar la radiodensidad en cada una de una o de varias capas concéntricas de tejido perivascul ar; y determinar si uno o varios de los valores cuantificados de la radiodensidad están por encima o por debajo de un valor de referencia de la radiodensidad.

La invención proporciona un método para la caracterización volumétrica de tejido perivascul ar usando datos recogidos a partir de una exploración con TC a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, comprendiendo el método además: determinar una representación gráfica del valor multiplicativo de cambio en la radiodensidad cuantificada en relación con la radiodensidad de referencia en cada una de una o varias capas concéntricas más de tejido perivascul ar con respecto a la distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo hasta una distancia final; determinar el área de la región definida por la representación gráfica del valor multiplicativo de cambio en la radiodensidad cuantificada y una representación gráfica de la radiodensidad de referencia con respecto a la distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo hasta la distancia final; y dividir dicha área por la radiodensidad cuantificada medida a una distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo, en donde la distancia es menor que el radio del vaso o es una distancia desde la superficie exterior del vaso, por debajo de la cual la radiodensidad cuantificada del tejido adiposo disminuye más de un 5% en comparación con la radiodensidad de referencia del tejido adiposo en un vaso del mismo tipo exento de enfermedad, en donde la radiodensidad de referencia del tejido adiposo es un valor determinado desde la primera capa de 1 mm de espesor que rodea la pared exterior del vaso.

De acuerdo con aspectos adicionales, que no forman parte de la invención, esta descripción comprende el uso de un método para la caracterización volumétrica de tejido perivascul ar usando datos recogidos a partir de una exploración con TC a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, comprendiendo el método: cuantificar la radiodensidad en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascul ar; y determinar si uno o varios de los valores cuantificados de la radiodensidad están por encima o por debajo de un valor de la radiodensidad de referencia, en el diagnóstico de una enfermedad vascular.

Descripción de los dibujos

La invención se describe haciendo referencia a las siguientes Tablas y Figuras en las que:

La **Figura 1** muestra una caracterización volumétrica de la arteria coronaria derecha. La pared vascular se escaneó a 40 mm de distancia, en la parte proximal de la arteria coronaria derecha (RCA por sus siglas en inglés, 1 cm distalmente del al orificio derecho) en angiografías con TC coronarias de 70 sujetos: sujetos sin enfermedad de la arteria coronaria (CAD, por sus siglas en inglés) (sin CAD, n = 10), pacientes con CAD con enfermedad coronaria derecha (RCA) (CAD RCA, n = 10), pacientes con CAD sin enfermedad RCA (CAD no RCA, n = 8), pacientes con injerto de derivación de la arteria post-coronaria (CABG, por sus siglas en inglés) con enfermedad RCA (CABG RCA, n = 29) y pacientes post-CABG sin enfermedad RCA (CABG no RCA, n = 13). El tejido perivascul ar se segmentó en capas concéntricas en serie de 1 mm de espesor que se extendían hasta una distancia de 20 mm desde la pared exterior de la arteria. Los valores de la radiodensidad se calcularon para cada capa individual y se representaron gráficamente frente a la distancia desde la pared exterior de la RCA para cada grupo. La radiodensidad disminuía al aumentar la distancia desde la pared de la RCA en todos los grupos, pero el patrón de la disminución de la radiodensidad era significativamente diferente entre los grupos. Los valores de P se calcularon a partir de mediciones repetidas de ANOVA.

La **Figura 2** muestra el patrón de cambio de la radiodensidad del tejido adiposo perivascul ar alrededor de la arteria coronaria derecha en diversos estados de enfermedad. Los valores de la radiodensidad del tejido adiposo se calcularon para cada capa concéntrica de 1 mm de espesor alrededor de la pared exterior de la arteria coronaria derecha y se representaron gráficamente como el valor multiplicativo de los cambios con respecto a la distancia desde la pared exterior del vaso. A) No CAD = sujetos sin enfermedad de la arteria coronaria (n = 10), B) RCA-CAD = pacientes con enfermedad RCA (n = 10), C) no RCA CAD = pacientes con CAD pero sin enfermedad RCA (n = 8), D) CABG RCA CAD = pacientes con injerto de derivación de la arteria post-coronaria (CABG) con enfermedad RCA (n = 29) y E) CABG no RCA CAD = pacientes con CAD post-CABG sin enfermedad RCA (n = 13).

La **Figura 3** muestra que el Índice de Caracterización Volumétrica Perivascul ar (VPCI-i, por sus siglas en inglés)

predice la presencia de enfermedad arterial coronaria. Las representaciones gráficas del cambio de la radiodensidad del tejido adiposo perivascular alrededor de la arteria coronaria derecha, con respecto a la distancia desde la pared exterior del vaso (Figura 2) se utilizaron para calcular el área bajo la curva (AUC) empleando la línea horizontal que pasa a través de $y=1$ como valor de referencia (radiodensidad expresada como valor multiplicativo de los cambios). El AUC por debajo del valor de referencia tenía valores positivos, mientras que el AUC por encima del valor de referencia tenía valores negativos, representados gráficamente como áreas sombreadas para cada grupo de pacientes (A a E). La suma algebraica de las AUCs dividida por el valor absoluto de la radiodensidad de PVAT (tejido adiposo que está a una distancia igual al radio del vaso alrededor de la pared vascular exterior) se utilizó para calcular el VPCI-i para cada grupo. VPCI- i_{20} (A) y VPCI- i_{10} (B) eran significativamente diferentes entre los grupos de pacientes. Las comparaciones estadísticas de VPCI- i_{20} y VPCI- i_{10} entre los grupos se realizaron con MedCalc®, mediante el uso de ANOVA de 2 vías para la interacción [distancia] x [grupo] después de una corrección de Bonferroni para comparaciones entre 5 grupos. * $p < 0,05$ frente a un grupo no CAD.

La **Figura 4** muestra la asociación entre la puntuación de la caracterización volumétrica perivascular (VPCS) y la calcificación coronaria. Los vasos coronarios con VPCS más altas se asociaban con un mayor volumen de calcificación de la pared de la arteria coronaria. El calcio se definió como todos los vóxeles de la pared vascular con valores en UH >600 . Valor de P para ANOVA de una vía después de la corrección de Bonferroni para comparaciones entre los tres grupos. (I <2 , II: 2-8, III >8).

La **Figura 5** muestra que VPCI como una variable continua y VPCS como una variable categórica (I <2 , II: 2-8, III >8) estaban relacionados significativamente con el volumen total de placa fibrosa en la arteria coronaria subyacente. La placa fibrosa se definió como aquellos vóxeles de la pared vascular con valores cuantificados de radiodensidad entre 65 y 260 UH.

La **Figura 6** muestra asociaciones entre el tejido adiposo perivascular y las características de las placas en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria. Cuarenta y dos pacientes coronarios fueron explorados mediante angiografía coronaria por TC como parte del estudio AdipoRedOx. Había una asociación positiva notable entre el volumen de la placa fibrosa y la densidad del PVAT (A) pero no del no PVAT (B), indicando que los cambios del PVAT más próximas a las arterias humanas están asociados con un mayor volumen de placa fibrosa. La diferencia en las densidades de PVAT y no PVAT (VPCI) era un valor predictivo del volumen de la placa fibrosa coronaria (C). El núcleo necrótico se definió como aquellos vóxeles de la pared vascular con valores de radiodensidad entre -1 y 64 UH, la placa fibrosa se definió como aquellos vóxeles de la pared vascular con valores de radiodensidad entre 65 y 260 UH y el calcio se definió como todos los vóxeles de la pared vascular con valores de radiodensidad >600 UH. Los valores de P se obtienen a partir de ANOVA después de la corrección de Bonferroni para comparaciones entre 3 grupos.

La **Figura 7** muestra asociaciones entre los valores de la puntuación de la caracterización volumétrica del tejido perivascular y las características de las placas en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria. La angiografía coronaria por TC se llevó a cabo en cuarenta y dos pacientes coronarios como parte del estudio AdipoRedOx. La puntuación de la Caracterización Volumétrica Perivascular (VPCS) junto con el volumen del núcleo necrótico y el volumen de calcificación de la pared arterial de la arteria coronaria derecha, se calcularon en las imágenes del TC potenciadas con contraste. Había una asociación positiva entre la VPCS y el grado de calcificación de la pared de la arteria coronaria (A). También había una tendencia hacia un mayor volumen de núcleo necrótico con VPCS más altas, aunque esto no alcanzó una significación estadística (B). El núcleo necrótico se definió como aquellos vóxeles de la pared vascular con valores de radiodensidad entre -1 y 64 UH, y el calcio como todos los vóxeles de la pared vascular con valores de radiodensidad >600 UH. Los valores de P se obtienen a partir de Kruskal Wallis para comparaciones entre 3 grupos.

La **Figura 8** muestra la caracterización del tejido perivascular alrededor de un segmento de 40 mm de la arteria coronaria derecha (punto de partida del análisis 1 cm distalmente hasta el orificio derecho). Se muestran los vóxeles correspondientes al tejido adiposo perivascular (PVAT, -190 UH a -30 UH), correspondientes al agua (-15 UH a +15 UH) y correspondiente a tejido no adiposo (+15 a +120 UH). El tejido perivascular se segmentó en capas concéntricas en serie de 1 mm de espesor que se extendían hasta una distancia de 20 mm desde la pared exterior de la arteria. La radiodensidad cuantificada de PVAT en cada capa concéntrica se representa gráficamente como un valor multiplicativo de los cambios en comparación con la radiodensidad de referencia frente a la distancia desde la pared exterior del vaso (B). Basándose en el radio del vaso, el PVAT se distingue del no PVAT (nP VAT) y se calculan los índices de caracterización volumétrica perivascular. El área bajo la curva (AUC, área sombreada en gris) dividida por la radiodensidad cuantificada para PVAT proporciona el índice VPCI- i_a aunque la diferencia entre la radiodensidad cuantificada para PVAT y la radiodensidad cuantificada para nPVAT es el índice VPCS. La representación gráfica del contenido en agua del tejido perivascular (expresado como % en volumen del volumen de PVAT en cada capa concéntrica, C) también se puede utilizar para evaluar el contenido en agua del tejido perivascular, como un índice secundario de la inflamación del tejido perivascular.

La **Figura 9** muestra un ejemplo de la caracterización del tejido perivascular alrededor de un segmento de 40 mm de la arteria descendente anterior izquierda con punto de partida del análisis 1 cm distalmente a la bifurcación del tronco principal izquierdo. Se muestran vóxeles correspondientes a PVAT (-190 UH a -30 UH), correspondientes a agua (-15 UH a +15 UH) y correspondientes a tejido no adiposo (+15 a +120 UH) (A). El tejido perivascular se segmentó en capas concéntricas en serie de 1 mm de espesor que se extendían hasta una distancia de 20 mm desde la pared

exterior de la arteria. El PVAT se definió como el tejido adiposo que se encuentra dentro de una distancia igual al radio del vaso, y la radiodensidad cuantificada de PVAT en cada capa concéntrica se representa gráficamente como un valor multiplicativo de los cambios en comparación con la radiodensidad de referencia frente a la distancia desde la pared exterior del vaso (B).

5 La **Figura 10** muestra un ejemplo de la caracterización del tejido perivascular alrededor de un segmento de 40 mm de la arteria circunfleja izquierda con punto de partida del análisis 1 cm distalmente a la bifurcación del tronco principal izquierdo. Se muestran, los vóxeles correspondientes a PVAT (-190 UH a -30 UH), correspondientes a agua (-15 UH a +15 UH) y correspondientes a tejido no adiposo (+15 a +120 UH) (A). El tejido perivascular se segmentó en capas concéntricas en serie de 1 mm de espesor que se extendían una distancia de 20 mm desde la pared exterior de la arteria. El PVAT se definió como el tejido adiposo que se encuentra dentro de una distancia igual al radio del vaso, y la radiodensidad cuantificada de PVAT en cada capa concéntrica se representa gráficamente como el valor multiplicativo de los cambios en comparación con la radiodensidad r de referencia frente a la distancia desde la pared exterior del vaso (B).

15 La **Figura 11** muestra la caracterización volumétrica de tejido adiposo periaórtico alrededor de un segmento de la aorta abdominal. El tejido perivascular se segmentó en capas concéntricas en serie de 1 mm de espesor que se extendían una distancia de 20 mm desde la pared exterior de la aorta (A). Los valores de la radiodensidad se calcularon para cada capa individual y se representaron gráficamente frente a la distancia desde la pared exterior de una aorta sana (círculos blancos) y un aneurisma aórtico (círculos negros). Un patrón diferente de cambio de la radiodensidad se observó en el tejido adiposo periaórtico (expresado como valor multiplicativo de los cambios) en presencia de un aneurisma de la aorta en comparación con una aorta sana.

20 La **Figura 12** muestra una caracterización volumétrica del tejido perivascular alrededor de la arteria femoral derecha. Se muestran los vóxeles correspondientes a PVAT (-190 UH a -30 UH), correspondientes a agua (-15 UH a +15 UH) y correspondientes a tejido no adiposo (+15 a +120 UH) (A). El tejido perivascular se segmentó en capas concéntricas en series de 1 mm de espesor que se extendían una distancia de 20 mm desde la pared exterior de la arteria. El PVAT se definió como el tejido adiposo que se encuentra dentro de una distancia igual al radio del vaso, y la radiodensidad cuantificada de PVAT en cada capa concéntrica se representa gráficamente como el valor multiplicativo de los cambios en comparación con la radiodensidad de referencia frente a la distancia desde la pared exterior del vaso (B).

25 La **Figura 13** muestra un análisis histológico de biopsias de tejido adiposo epicárdico (EpAT), torácico (ThAT) y subcutáneo (ScAT) en el grupo de estudio 1. Las **Figuras 13A-D** muestran que EpAT y ThAT contienen adipocitos significativamente menores que en comparación con ScAT (n = 7 pacientes). Las **Figuras 13E-G** muestran estudios de la expresión génica en tejido procedente de toda la cohorte en el grupo de estudio 1 (n = 453), se midió una mayor expresión génica del receptor- γ activado por la proliferación del peroxisoma (*PPAR- γ* , un marcador de la fase temprana de la diferenciación de adipocitos, Figura 13E), *CEBPA* (marcador de la fase tardía de la diferenciación de adipocitos, Figura 13F) y *FABP4* (marcador de la diferenciación terminal de adipocitos, Figura 13G) en ScAT en comparación con EpAT o ThAT.

30 La **Figura 14A** muestra un diseño experimental de experimentos de cocultivo en el grupo de estudio 2 en el que se recogió tejido aórtico humano (Ao) a partir de 15 pacientes sometidos a injerto de derivación de la arteria coronaria y se cultivó durante 7 días +/- angiotensina II (AngII) 100 nM. Preadipocitos aislados a partir de tejido adiposo perivascular (PVAT) alrededor de la RCA, también se cultivaron durante ese periodo. Una semana más tarde, el Ao se lavó para eliminar la angiotensina II (Ang II) y se cocultivó con los preadipocitos. Después se indujo un curso temporal de diferenciación. La **Figura 14B** muestra que la Ang II inducía la expresión de citocinas inflamatorias en el Ao (es decir, interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ)). La **Figura 14C-F** muestra que el cocultivo de preadipocitos con Ao preestimulado con Ang II impedía la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros, como se demostraba por la falta de gotitas de lípidos en esos adipocitos el día 9 de la diferenciación, en comparación con preadipocitos diferenciados sin Ao. *P <0,05 frente al control.

35 La **Figura 15** muestra la asociación entre la radiodensidad promedio del tejido adiposo (radiodensidad cuantificada, QR) en imágenes por tomografía computarizada (TC) sin contraste y con contraste en el tejido adiposo epicárdico (EpAT). La **Figura 15A** muestra una fuerte correlación entre la QR en imágenes de TC con contraste frente a sin contraste. La **Figura 15B** muestra que no había una diferencia significativa en los valores absolutos de la QR entre imágenes de TC con contraste y sin contraste.

40 La **Figura 16** muestra el efecto de las citocinas sobre la diferenciación de preadipocitos humanos aislados a partir de tejido adiposo perivascular (PVAT) alrededor de la arteria coronaria derecha y diferenciados en presencia o ausencia de citocinas inflamatorias (TNF- α recombinante (4 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml) e IFN- γ (20 ng/ml)). Las **Figuras 16A-D** muestran que las citocinas proinflamatorias inhiben la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros tal y como se determina por sus cambios morfológicos y su falta de acumulación de gotitas de lípidos que se demostraba mediante tinción con aceite rojo O. La **Figura 16E** muestra una cuantificación fotométrica de las mediciones de la tinción con aceite rojo O. Las **Figuras 16F-I** muestran que las citocinas activan la proliferación de preadipocitos (F) y suprimen la expresión génica de los marcadores de la diferenciación, receptor- γ activado por la proliferación del peroxisoma (*PPAR- γ* ; G), proteína alfa que se une a CCAAT/potenciador (*CEBPA*; H) y proteína 4 que se une a

ácido graso (*FABP4*; I) en esas células. *p <0,05, **p <0,01 frente al grupo de control.

La **Figura 17** muestra un análisis de la expresión génica y mediciones de la radiodensidad promedio del tejido adiposo (radiodensidad cuantificada, QR) en explantes de tejido adiposo epicárdico (EpAT), torácico (ThAT) y subcutáneo (ScAT) procedente de 453 pacientes sometidos a un injerto de derivación de la arteria coronaria (grupo de estudio 1). Las muestras de tejido adiposo se exploraron mediante tomografía computarizada (CT) y la QR para cada muestra se calculó como la radiodensidad promedio de la grasa (-190 a -30 unidades Hounsfield). Cada explante se dividió en terciles basándose en los valores medidos de la QR. El intervalo de la QR en cada tercil era: para EpAT (bajo: -120 a -84,3 UH, medio: -84,1 a -73,0 UH, alto: -72,9 a -52,7 UH), para ThAT (bajo: -125 a -77,7 UH, medio: -77,6 a -68,7 UH, alto: -68,6 a -49,8 UH) y para ScAT (bajo: -128,0 a -84,4 UH, medio: -84,3 a -74,2 UH, alto: -74,1 a -56,1 UH). Las **Figuras 17A-F** muestran una fuerte correlación inversa entre los valores de QR y los niveles de expresión de *CEBPA* (un marcador de la fase tardía de la diferenciación de adipocitos) y *FABP4* (un marcador de la diferenciación terminal de los adipocitos) en los mismos explantes en todos los depósitos de tejido adiposo. La **Figura 17G** muestra una correlación inversa entre el tamaño de los adipocitos y el valor de QR medido *in vivo* en explantes de tejido adiposo. Las **Figuras 17H-I** muestran la QR *in vivo* de tejido adiposo fuertemente asociado con la QR de los explantes de tejido adiposo, recogidos a partir de los mismos pacientes durante una cirugía, tanto en EpAT como ScAT.

La **Figura 18** muestra un análisis de la expresión génica y mediciones de la radiodensidad promedio del tejido adiposo (radiodensidad cuantificada, QR) en explantes de tejido adiposo epicárdico (EpAT) y subcutáneo (ScAT) de 105 pacientes del grupo de estudio 1. El tejido adiposo se sometió a una exploración mediante angiografía con tomografía computarizada (CT), mientras que las muestras de tejido adiposo epicárdico (EpAT) y subcutáneo (ScAT) se recogieron durante una cirugía para estudios de expresión génica para determinar el estado de diferenciación de los adipocitos. Se calculó una QR *in vivo* para cada depósito de tejido adiposo como la radiodensidad promedio de la grasa (-190 a -30 Unidades Hounsfield). Cada explante se dividió en terciles basándose en los valores de QR medidos. El intervalo de la QR en cada tercil era: para EpAT (bajo: -81,6 a -74,7 UH, medio: -74,8 a -70,7 UH, alto: -70,9 a -61,0 UH) y para ScAT (bajo: -108 a -101 UH, medio: -101 a -97 UH, alto: -97 a -89 UH). Las **Figuras 18A-D** muestran una fuerte correlación inversa entre los valores de QR y los niveles de expresión de *CEBPA* (un marcador de la fase tardía de la diferenciación de adipocitos) y *FABP4* (un marcador de la diferenciación terminal de los adipocitos) en los mismos explantes en todos los depósitos de tejido adiposo.

La **Figura 19** muestra el efecto de las citocinas proinflamatorias sobre la diferenciación de adipocitos *in vitro*. Preadipocitos humanos se aislaron a partir de tejido adiposo pericoronario recogido a partir de pacientes sometidos a una cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria, y se diferenciaban a adipocitos en presencia o ausencia de citocinas inflamatorias: interleucina 6 (2 ng/ml), factor de necrosis tumoral alfa (4 ng/ml) e interferón γ (20 ng/ml). La inhibición de la diferenciación de los preadipocitos es evidente por la acumulación de gotitas de lípidos durante el curso del experimento.

La **Figura 20** muestra el análisis de muestras de tejido adiposo pericoronario en las proximidades de la arteria coronaria derecha (RCA) y a 2 cm de distancia de la misma en 15 pacientes sometidos a un injerto de derivación de la arteria coronaria (grupo de estudio 2). Las muestras de tejido adiposo se utilizaron para estudios de expresión génica para determinar el estado de diferenciación de los adipocitos y para una histología para determinar el tamaño de los adipocitos. Las **Figuras 20A-C** muestran que el tejido adiposo pericoronario cerca de la RCA expresaba niveles significativamente más bajos de *PPAR- γ* , *CEBPA* y *FABP4* (marcadores de la diferenciación de adipocitos de fase temprana, tardía y terminal, respectivamente). La **Figura 20D** muestra datos histológicos que muestran que los adipocitos del tejido adiposo pericoronario cerca de la RCA eran significativamente más pequeños que los más alejados de la RCA. Las **Figuras 20E-H** muestran una determinación de los valores de la radiodensidad promedio (radiodensidad cuantificada, QR) del tejido adiposo alrededor de la RCA de pacientes sometidos a angiografía TC clínica en el grupo de estudio 3 (n = 273). La QR se calculó como la radiodensidad promedio de la grasa (-190 a -30 Unidades Hounsfield) para cada capa cilíndrica de 1 mm de espesor de tejido pericoronario alrededor de la RCA, para una distancia radial desde la pared de la RCA de 1 mm a 20 mm. La **Figura 20I** muestra que había una caída en los valores medidos de la QR cuando la exploración se trasladaba desde cerca del vaso al tejido alejado del mismo, lo que refleja los cambios en el estado de diferenciación de los adipocitos y el tamaño. Una diferencia significativa es evidente cuando el valor de QR se representa gráficamente frente a la distancia desde la pared exterior de la RCA para pacientes con enfermedad arterial coronaria (n = 156) y pacientes con arterias coronarias sanas (n = 117). *P<0,05 frente a 1 mm

La **Figura 21** muestra el análisis de la radiodensidad promedio de PVAT (radiodensidad cuantificada de PVAT - QR_{PVAT}) y valores de VPCI% [de los pacientes en el grupo de estudio 3. La puntuación total del calcio y de la arteria coronaria derecha (RCA) se calculó a partir de la angiografía de TC, y un segmento de 40 mm de la RCA proximal (10 mm después de su origen ostial) se rastreó para un análisis adicional del tejido adiposo perivasculoso circundante (PVAT) y el segmento vascular subyacente. La QR_{PVAT} se calculó como la radiodensidad promedio del tejido adiposo (-190 a -30 UH, situado a una distancia radial desde la pared vascular exterior igual al diámetro promedio del vaso) y los valores de VPCI% correspondientes se calcularon como la diferencia porcentual entre cada valor individual de QR_{PVAT} y la QR del tejido adiposo epicárdico a 2 cm de distancia de la RCA. Las **Figuras 21A-B** muestran que pacientes con valores elevados de QR_{PVAT} y VPCI% alrededor de la RCA tenían puntuaciones totales de calcio más altas, pero no había una correlación entre QR_{PVAT} o VPCI% con un volumen de calcificación en la RCA subyacente.

El volumen de calcio se definió como el volumen de la pared vascular ocupado por vóxeles con atenuación >465 UH. Las **Figuras 21C- D** muestran que valores de QR_{PVAT} y $VPCI\%$ más elevados alrededor de la RCA se asociaban con una mayor carga de placa aterosclerótica en pacientes sin CAD (definida como la carga de placa aterosclerótica en el tercil superior) y aumentaban aún más en pacientes con CAD. Las **Figuras 21E-F** muestran que en los pacientes con CAD con presencia de placas ateroscleróticas en el segmento de RCA subyacente (carga de placa aterosclerótica en la RCA proximal dentro de los 2 terciles superiores), el $VPCI\%$ (pero no QR_{PVAT}) era significativamente más elevado en presencia de placas blandas (volumen de calcificación = 0) en comparación con las placas mixtas o calcificadas.

La **Figura 22** muestra que una inflamación vascular da lugar a una mayor expresión y liberación de mediadores proinflamatorios a partir de la pared arterial. Tales estímulos proinflamatorios actúan sobre el tejido adiposo perivascular circundante (PVAT) mediante una activación de la proliferación y una inhibición de la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros, haciendo que los adipocitos que están más cerca de la pared vascular inflamada tengan menor tamaño y estén menos diferenciados que en comparación con los adipocitos que se encuentran más lejos del vaso. Estos efectos biológicos de los vasos "inflamados" sobre su tejido adiposo circundante, cambian el contenido hidrófilo/lipófilo del PVAT y se pueden detectar mediante la formación de imágenes con Tomografía Computarizada en forma de una mayor radiodensidad de PVAT (radiodensidad cuantificada o QR_{PVAT}). El gradiente de la QR desde el PVAT a no PVAT (a 20 mm de distancia de la pared del vaso) se describe por el índice de caracterización volumétrica perivascular ($VPCI$), que también es diferente entre los vasos inflamados y no inflamados.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han descubierto que el 'patrón' de cambio en la radiodensidad del PVAT a lo largo de una distancia especificada de la pared vascular exterior, proporciona una información valiosa sobre el vaso sanguíneo. La presente invención proporciona tanto un método para la caracterización volumétrica del tejido perivascular, como métodos para diagnosticar una enfermedad vascular que no dependen del volumen del PVAT y que, por lo tanto, son menos propensos a factores de confusión relacionados con la expansión del tejido adiposo. Los métodos proporcionados son ventajosos ya que proporcionan a los médicos una evaluación objetiva de la salud vascular de un paciente sin necesidad de ningún procedimiento de análisis invasivo. Usando los métodos de la invención, la salud vascular de cada paciente se puede evaluar cuantitativamente con el fin de permitir un diagnóstico e identificación de lo que sea necesario para pruebas adicionales. Como resultado, se puede identificar una enfermedad vascular en pacientes asintomáticos y tratar antes y más eficazmente, el tratamiento se puede seguir de manera más eficaz, en una intervención en investigación y terapéutica se puede dirigir de manera más apropiada, y se pueden gestionar mejor los recursos en el sistema sanitario. Además, la invención permite una estratificación de la salud vascular de los pacientes, lo que permite una intervención terapéutica dirigida que conduce a una mejora de los resultados en el paciente con costes reducidos.

El método para una caracterización volumétrica del tejido perivascular implica el uso de datos recogidos a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, y comprende dos etapas: la cuantificación de la radiodensidad para cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular; y determinar si uno o varios de esos valores de la radiodensidad están por encima o por debajo de un valor de radiodensidad de referencia.

El tejido perivascular se detecta en una exploración por tomografía computarizada (TC) de una extensión especificada de un vaso sanguíneo, utilizando un programa informático para el análisis de imágenes. El tejido perivascular se somete entonces a una segmentación volumétrica en una serie de capas concéntricas que son coaxiales con el vaso sanguíneo, y se calcula la radiodensidad del PVAT dentro de cada capa concéntrica. Los vóxeles que contienen PVAT se identifican mediante la aplicación de umbrales de radiodensidad específicos, desde -190 a -30 UH, que excluyen el tejido no adiposo del análisis, y se determina una radiodensidad de los vóxeles que contienen PVAT dentro de cada capa concéntrica. El valor de la radiodensidad determinado para cada una de una o varias capas concéntricas individuales se compara entonces con un valor de la radiodensidad de PVAT de referencia, determinado a partir del mismo conjunto de datos de la exploración con TC. De esta manera, se puede realizar una caracterización volumétrica global, total del tejido adiposo que se encuentra alrededor de un vaso sanguíneo sin depender de definiciones espaciales arbitrarias de 'perivascular' y empleando una medición objetiva de la radiodensidad usando las Unidades de Hounsfield. Una comparación de la radiodensidad determinada del PVAT con una radiodensidad de referencia del PVAT para más de una capa concéntrica, proporciona una indicación clara del estado de los depósitos de PVAT con respecto a la distancia desde la pared del vaso sanguíneo.

La expresión "tejido perivascular" en el contexto de la presente invención, se entiende que es el tejido que rodea un vaso sanguíneo. El tejido perivascular puede incluir tejido adiposo perivascular.

En el contexto de la presente invención, una "exploración por tomografía computarizada" se entiende que es una exploración generada usando rayos X, procesada por ordenador para producir imágenes tomográficas de áreas específicas de la región perivascular explorada. La expresión "exploración por tomografía computarizada" es sinónimo de las expresiones exploración TC y exploración TAC.

La radiodensidad, medida en unidades Hounsfield (UH), es una medida de la incapacidad relativa de los rayos X

para pasar a través de un material. Una medición de los valores de la radiodensidad permite distinguir entre tipos de tejidos en la TC, basándose en sus diferentes radio-opacidades. La grasa no es muy radiodensa, y se mide normalmente entre -190 y -30 UH, mientras que el músculo, la sangre y el hueso se miden entre +10 y +40, entre +30 y +45 y entre +700 y +3000 UH respectivamente.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "radiodensidad de referencia" se entiende que es un valor de la radiodensidad determinado a partir de la primera capa de 1 mm de espesor que rodea la pared exterior del vaso sanguíneo. Este valor se puede determinar a partir de un vóxel representativo o una población de vóxeles dentro de la capa de 1 mm de espesor, por ejemplo, los vóxeles que contienen tejido adiposo o agua. El valor de referencia se puede determinar a partir de cualquiera de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular que se analizan.
10 Preferiblemente, el valor de la radiodensidad de referencia es un valor de la radiodensidad "promedio" calculado a partir de una población de vóxeles en esa capa. Se entiende que un valor de radiodensidad de referencia se puede calcular usando los mismos datos de la TC utilizados para determinar la radiodensidad en cada una de una o varias capas concéntricas del tejido perivascular, pero se entiende que un valor de radiodensidad de referencia se puede calcular basándose en los datos recogidos a partir de una población de grupos de datos de una exploración TC.

15 En el contexto de la presente invención, un valor "promedio" se entiende que significa un valor central o típico, y se puede calcular a partir de una muestra de valores medidos usando fórmulas que son ampliamente conocidas y apreciadas en la técnica. Preferiblemente, el promedio se calcula como la media aritmética de la muestra de valores de radiodensidad, pero también se puede calcular como la media geométrica, la media armónica, la mediana o el modo de un conjunto de valores de radiodensidad recogidos. El valor promedio se puede calcular haciendo referencia a los
20 datos recogidos a partir de todos los vóxeles dentro de una capa de tejido concéntrico o haciendo referencia a una población seleccionada de vóxeles dentro de la capa de tejido concéntrico, por ejemplo, vóxeles que contienen agua o tejido adiposo.

En el contexto de la presente invención, la expresión "capas concéntricas de tejido perivascular" se entiende que significa capas coaxiales de tejido perivascular que rodean un vaso sanguíneo, en donde cada capa concéntrica es
25 concéntrica y se encuentra a una distancia constante de la pared exterior de un vaso sanguíneo.

Preferiblemente, la exploración CT de una sección de un vaso sanguíneo se lleva a cabo usando métodos de rutina e instrumentos disponibles comercialmente.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la caracterización volumétrica de tejido perivascular usando datos recogidos a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de cierta
30 longitud de un vaso sanguíneo, que comprende cuantificar la radiodensidad en cada una de una o varias capas concéntricas del tejido perivascular y determinar si uno o varios de los valores cuantificados de la radiodensidad están por encima o por debajo de un valor de referencia de la radiodensidad. La radiodensidad de cada vóxel dentro de cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular se puede determinar, y mediante la selección de unos intervalos de radiodensidad específicos es posible proporcionar una caracterización volumétrica de distintos
35 materiales y tipos de tejidos dentro de esas capas. La selección de los vóxeles con valores de radiodensidad entre -190 y -30 unidades Hounsfield (UH), restringe la cuantificación de los vóxeles que representan el tejido adiposo dentro de la capa. La selección de los vóxeles con valores de radiodensidad entre -15 UH y +15 UH, restringe la cuantificación de los vóxeles que representan agua dentro de la capa. Mediante la aplicación de estos umbrales específicos, se pueden analizar todos los vóxeles que corresponden a tejido adiposo o a agua, y se puede caracteri-
40 zar el tejido adiposo que rodea un segmento vascular. La radiodensidad del conjunto de datos volumétricos seleccionados que se corresponden con el tejido adiposo, proporciona una información sobre la composición del tejido adiposo, en donde una mayor radiodensidad indica la presencia de adipocitos más pequeños, mientras que más agua sugiere un aumento de los niveles de inflamación dentro del tejido.

En una realización particular, la presente invención proporciona el método que utiliza los datos recogidos a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, para la caracteri-
45 zación volumétrica de tejido adiposo perivascular mediante la selección de los vóxeles que tienen valores de radiodensidad entre -190 UH y -30 UH para la cuantificación de un valor de la radiodensidad que se compara con el valor de referencia.

En otra realización particular, la presente invención proporciona el método que utiliza los datos recogidos a partir de una tomografía computarizada a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, para la caracterización volumétri-
50 ca del contenido en agua en el tejido perivascular mediante la selección de los vóxeles que tienen valores de radiodensidad entre -15 UH y +15 UH para la cuantificación de un valor de la radiodensidad que se compara con el valor de referencia.

El valor de la radiodensidad cuantificada se puede proporcionar como un valor promedio para permitir la compara-
55 ción de los valores procedentes de capas de tejido que tienen diferentes volúmenes. Los valores promedio se calculan normalmente como simples medias aritméticas de la muestra de valores de la radiodensidad medidos a partir de vóxeles individuales dentro de cada capa.

El método de la presente invención se puede emplear para proporcionar una caracterización volumétrica del tejido

perivascular que rodea cualquier vaso sanguíneo utilizando los datos obtenidos a partir de una exploración TC. En realizaciones particulares, se usa el método para caracterizar el tejido perivascular que rodea la arteria coronaria derecha y el tejido perivascular que rodea la aorta. Se pueden seleccionar capas de cualquier espesor adecuado para el análisis de acuerdo con el método de la presente invención. Sin embargo, es muy deseable proporcionar una caracterización de alta resolución del tejido perivascular, y esto se logra sometiendo las capas concéntricas más delgadas del tejido a los métodos de la presente invención. En una realización particular, las capas tienen 1 mm de espesor.

Una forma conveniente de resumir la caracterización volumétrica del tejido perivascular empleando el método de la presente invención es representándola como uno o varios valores individuales. En consecuencia, los inventores han definido el Índice integral de Caracterización Volumétrica del Tejido Perivascular (VPCI- i_a) y el VPCI(%) para definir el patrón de cambio en el tejido perivascular a lo largo de una distancia radial especificada (a) desde la pared del vaso sanguíneo. El número de veces de cambios en la radiodensidad cuantificada en relación con la radiodensidad de referencia en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular, se representa gráficamente frente a la distancia de cada una de una o varias capas concéntricas de la pared del vaso. La radiodensidad cuantificada medida en cualquier capa apropiada puede servir como referencia. Lo más conveniente es seleccionar el valor de la radiodensidad cuantificada medido en la capa de tejido que se encuentra en contacto directo con el vaso sanguíneo como valor de la radiodensidad de referencia. Se calcula el área de la región unida por la gráfica del número de veces de cambio en la radiodensidad cuantificada y una representación gráfica de la radiodensidad de referencia con respecto a la distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo, y este valor se divide por un valor de la radiodensidad cuantificada medido a una distancia especificada (y) desde la pared del vaso sanguíneo. El cálculo de VPCI- i_a / VPCI(%) se puede representar matemáticamente del modo siguiente:

$$VPCI-i_a = \frac{\int_1^a h(B) - h(x) dx}{|h(y)|}$$

$$VPCI(\%)_a = \frac{100 * [(h(B) - h(x))]}{h(x)}$$

en donde

VPCI- i_a es el Índice integral de Caracterización Volumétrica del Tejido Perivascular hasta una distancia radial 'a' en mm desde la pared exterior del vaso sanguíneo

VPCI(%) $_a$ es el cambio porcentual en radiodensidad cuantificada a una distancia radial 'a' en mm desde la pared exterior del vaso sanguíneo

x es una distancia radial desde la pared exterior del vaso sanguíneo (en mm)

$h(x)$ es una radiodensidad cuantificada a una distancia radial 'x' en mm

$h(B)$ es la radiodensidad de referencia

B es la distancia en mm desde la pared exterior del vaso sanguíneo que define el 'valor de referencia'

$|h(y)|$ es el valor absoluto de la radiodensidad cuantificada medido a una distancia especificada, y , desde la pared del vaso sanguíneo

La distancia radial (a) para la que se calcula el patrón de cambio en la radiodensidad del tejido perivascular puede ser la distancia desde la superficie exterior de una pared vascular sana en la que la radiodensidad del PVAT alcanza el valor mínimo para el área anatómica explorada o una disminución >10% por debajo del valor de la radiodensidad de referencia, en donde la radiodensidad de referencia es un valor de la radiodensidad del tejido adiposo determinado a partir de la primera capa concéntrica de 1 mm de espesor que rodea la pared exterior del vaso sanguíneo. Los presentes inventores han descubierto que el cálculo de los valores de VPCI- i_{10} y VPCI- i_{20} proporcionan una información particularmente útil en relación con la salud de los vasos sanguíneos. Los valores de VPCI- i_{10} y VPCI- i_{20} predicen la presencia de enfermedad arterial coronaria (CAD) y son significativamente más bajos en sujetos con CAD que en comparación con sujetos de alto riesgo sin CAD (véanse las Figuras 1 y 2). VPCI- i_{10} es más sensible para identificar vasos con aterosclerosis mientras VPCI- i_{20} es mejor para la identificación de una aterosclerosis coronaria en general, incluso si no hay ninguna enfermedad significativa en el vaso subyacente. El uso de los índices de VPCI- i es útil para la caracterización del tejido alrededor de cualquier vaso, incluyendo la arteria coronaria derecha, el sistema coronario izquierdo y otros lechos vasculares que incluyen la aorta y la arteria femoral.

Es útil para distinguir entre el tejido perivascular adiposo (PVAT) y el tejido adiposo no perivascular (no PVAT). Esto distingue el tejido adiposo que se encuentra cerca del vaso sanguíneo, del tejido adiposo que se encuentra más alejado del vaso sanguíneo y que, por lo tanto, no se puede considerar perivascular. Un problema importante al que se enfrenta este ámbito hasta la fecha, es la falta de una definición significativa del PVAT. Mediante el uso de una

segmentación volumétrica del tejido perivascular, la presente invención proporciona una definición de PVAT como el tejido adiposo que se encuentra dentro de una distancia que es igual al radio del vaso desde la pared exterior o que es igual al punto en el que la radiodensidad del tejido adiposo disminuye en más de un 5%, en comparación con la radiodensidad de referencia del tejido adiposo en un vaso del mismo tipo exento de enfermedad, en donde la radiodensidad de referencia del tejido adiposo es un valor determinado a partir de la primera capa de 1 mm de espesor que rodea la pared exterior del vaso sanguíneo. Una distinción entre los dos tipos de tejido adiposo permite la determinación de otro índice útil para la salud vascular, el Índice de Caracterización Volumétrica Perivascular (VPCI), que se puede calcular restando la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular de la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular. En una realización particular, la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular se mide a una distancia que es igual al radio del vaso alrededor de la pared exterior del vaso sanguíneo. En una realización particular adicional, la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular se mide en una capa que se encuentra a una distancia que es igual a dos a tres veces el tamaño del radio promedio del vaso alrededor de la pared exterior del vaso sanguíneo. El cálculo del VPCI se puede representar matemáticamente del modo siguiente:

$$\text{VPCI} = [\text{QR}_{\text{PVAT}} - \text{QR}_{\text{nP VAT}}].$$

en donde

VPCI es el Índice de Caracterización Volumétrica Perivascular

QR_{PVAT} es la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular

$\text{QR}_{\text{nP VAT}}$ es la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular

O VPCI se puede expresar como el % de cambio en QR_{PVAT} desde $\text{QR}_{\text{nP VAT}}$ utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{VPCI}(\%) = [100 * (\text{QR}_{\text{PVAT}} - \text{QR}_{\text{nP VAT}})] / \text{QR}_{\text{PVAT}}$$

Los inventores han descubierto que la estratificación de los valores de VPCI en una escala que tiene un umbral inferior y un umbral superior permite la asignación de una puntuación de la caracterización volumétrica del tejido perivascular (VPCS) a cada vaso sanguíneo. Una VPCS de I se asigna cuando los valores de VPCI son iguales o inferiores al umbral inferior, una VPCS de II se asigna cuando los valores de VPCI están por encima del umbral inferior pero por debajo del umbral superior, y una VPCS de III se asigna cuando los valores de VPCI son iguales o superiores al umbral superior. En una realización particular, la presente invención proporciona una escala de VPCS en donde el valor del umbral inferior es 2,0 y el valor del umbral superior es 8,0.

Los índices de VPCI-i para la caracterización del tejido perivascular (VPCI- i_a y VPCS) se pueden aplicar a los vasos sanguíneos para evaluar su estado de salud.

Los vasos coronarios que tienen una mayor puntuación de VPCS, VPCI(%) e inferior de VPCI- i_a , se pueden diagnosticar como "enfermos" y por lo tanto se pueden diferenciar de los vasos coronarios sanos que están exentos de enfermedad. Estos índices son también útiles para predecir la tasa de progresión de una aterosclerosis coronaria. Por otra parte, una caracterización del tejido adiposo pericoronario de sujetos sin una enfermedad conocida de la arteria coronaria, puede proporcionar una valiosa información para el pronóstico del riesgo de desarrollar una enfermedad arterial coronaria, incluso en un estadio temprano, por encima y por debajo de la puntuación del calcio coronario, que es actualmente el único marcador biológico establecido para la formación de imágenes TC que proporciona una información para un pronóstico de ese tipo.

Otra aplicación útil de los índices QR_{PVAT} , VPCI(%) y VPCI-i se refiere a la aterosclerosis subclínica y su tasa de progresión. Actualmente, los médicos determinan el espesor de la capa íntima-media de las arterias carótidas (arterias del cuello), como un índice de aterosclerosis subclínica, ya que es un fuerte valor predictivo de futuros eventos cardiovasculares. QR_{PVAT} , VPCS, VPCI(%) y VPCI- i_a se pueden calcular para el tejido perivascular de las arterias carótidas y pueden proporcionar una información valiosa acerca de la tasa de progresión de una aterosclerosis subclínica. Esto ayudará a los médicos a recopilar una información adicional para el pronóstico de un riesgo de desarrollo de aterosclerosis en un estadio muy temprano, antes de la aparición de cualquier síntoma clínico. Del mismo modo, el tejido perivascular de las arterias periféricas (por ejemplo, la arteria femoral, Figura 11) se puede valorar para recoger una información para el pronóstico de un riesgo de desarrollar una enfermedad arterial periférica o su tasa de progresión en sujetos sin o con una enfermedad arterial periférica establecida, respectivamente.

QR_{PVAT} , VPCS, VPCI(%) y VPCI- i_a también pueden ser informativos para enfermedades de la aorta (Figura 10). Tanto la aorta torácica como la abdominal están rodeadas por una capa de tejido adiposo perivascular que puede estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad aórtica. La detección de cambios tempranos en el tejido adiposo periaórtico mediante el uso de los índices de QR_{PVAT} , VPCS, VPCI(%) y VPCI- i_a puede ayudar a identificar pacientes con riesgo de desarrollar aterosclerosis aórtica o incluso más importante, aneurismas aórticos. Por otra parte, en sujetos con aneurismas aórticos estables, diagnosticados, estables, un mayor QR_{PVAT} , VPCS, VPCI(%) y un menor VPCI- i_a respectivamente, puede proporcionar una valiosa información para el pronóstico del estado infla-

matorio del aneurisma y del riesgo de ruptura.

El mismo análisis se puede aplicar a cada lecho vascular del cuerpo humano, y QR_{PVAT} , VPCS, VPCI(%) y VPCI- i_a se pueden calcular para cada vaso individual. Las Figuras 7-11 demuestran un análisis de ese tipo para la arteria coronaria derecha, la arteria descendente anterior izquierda, la arteria circunfleja izquierda, la aorta y la arteria femoral.

La invención se describe adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1

Imágenes disponibles por tomografía computarizada (TC) de una exploración de 64 cortes (General Electric LightSpeed Ultra, General Electric, Milwaukee, WI, EE.UU.) se utilizaron para analizar el tejido perivascular y el fenotipo de la enfermedad vascular. La configuración de la adquisición se ajustó de acuerdo a los protocolos clínicos locales para lograr una calidad óptima de las imágenes. Las imágenes reconstruidas con contraste potenciado se transfirieron al Aquarius Workstation® de TeraRecon, Inc. (San Mateo, CA V.4.4.11) para un análisis volumétrico. Una reconstrucción 3D multiplanar curvada se utilizó para definir el segmento vascular de interés y para analizar el tejido perivascular. Se requirió que el lector trazara manualmente una región de interés y, a continuación el tejido perivascular se segmentó de una manera semiautomatizada en capas concéntricas alrededor de la pared vascular exterior. Se analizaron las características del tejido perivascular para determinar los valores de la radiodensidad para vóxeles correspondientes a tejido adiposo o a agua dentro de cada capa perivascular concéntrica, para los primeros 20 mm alrededor de la pared vascular exterior. Las curvas medias de la radiodensidad para tejido adiposo perivascular y agua se representaron gráficamente frente a la distancia desde la pared vascular exterior para calcular el Índice de Caracterización Volumétrica Perivascular (VPCI) y VPCI-integral (VPCI- i_a) como se describe en la descripción. Para el análisis de la morfología de la placa vascular, se adaptaron las definiciones previamente sugeridas (Obaid et al. *Circ Cardiovasc Imaging* 2013; 6:655-664): el núcleo necrótico se definió como -1 a +64 UH, la placa fibrosa como +65 a +260 UH y la calcificación vascular >600 UH.

Ejemplo 2

Población del estudio

El grupo de estudio 1 consistía en 453 pacientes sometidos a cirugía cardíaca en el Oxford University Hospitals NHS Trust (véase la Tabla 1). Los criterios de exclusión eran cualquier enfermedad o malignidad inflamatoria, infecciosa, hepática/renal. También se excluyeron los pacientes que recibían fármacos no esteroides antiinflamatorios. Durante la cirugía, se recogieron muestras de tejido adiposo, es decir, tejido adiposo subcutáneo (ScAT, procedente del sitio de la incisión en el pecho), torácico (ThAT, procedente de la zona central torácica, que se fija al pericardio) y epicárdico (EpAT, procedente del lugar de la ranura auriculoventricular derecha, lejos de cualquier vaso visible). Las muestras de tejido adiposo se congelaron de forma instantánea para estudios de expresión génica, histología y de formación de imágenes TC como explantes, tal y como se describe a continuación. Un subgrupo de 105 de esos pacientes se sometió también a una angiografía TC (CTA), como se describe a continuación, con el fin de enlazar las características histológicas y biológicas de las biopsias de tejido adiposo, con las características de la formación de imágenes de los mismos depósitos de tejido adiposo *in vivo* e *in vitro*.

El grupo de estudio 2 incluía a 37 pacientes sometidos a cirugía de injerto de derivación en la arteria coronaria (CABG), reclutados con los mismos criterios de inclusión/exclusión que en el grupo de estudio 1 (véase la Tabla 1). Muestras pareadas de PVAT (adyacente a la RCA proximal) y no PVAT EpAT (de una zona alejada 2 cm de la RCA, sobre el ventrículo derecho y no muy próximo a ninguna otra rama arterial coronaria) se recogieron para estudios de expresión génica. Además, se recogieron muestras de tejido aórtico (recogidas como "botones" desde el sitio de la anastomosis de injertos de derivación en la aorta ascendente) y se utilizaron para experimentos *ex vivo* de cocultivo con adipocitos primarios como se describe más adelante en este manuscrito.

El grupo de estudio 3, incluía una cohorte clínica de 273 pacientes que se sometió a CTA coronaria en OUH NHS Trust (156 con enfermedad de la arteria coronaria significativa y 117 sin, véase la Tabla 2). Esta cohorte se utilizó para validar los resultados generados a partir de los grupos de estudio 1 y 2 y aplicarlos en un entorno clínico.

Toma de muestras de sangre y mediciones de biomarcadores circulantes

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron a partir de los pacientes en el grupo de estudio 1, la mañana antes de la operación, después de 8 horas de ayuno. La insulina sérica se midió con un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes y la glucosa sérica por el método de la hexocinasa utilizando kits comerciales (ABBOTT, Wiesbaden Alemania). La resistencia a la insulina se definió mediante HOMA-IR, calculada usando la fórmula (glucosa x insulina)/405, con la glucosa medida en mg/dl y la insulina en mU/L (Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF y Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-9).

Medición del tamaño celular de los adipocitos

Las secciones de AT, almacenadas a -80°C en medio con temperatura óptima para el corte (OCT) se cortaron en secciones de 15 micras y se fijaron sobre portaobjetos. La unión no específica de antígeno se bloqueó usando solución bloqueante de proteína exenta de suero durante 1-2 h (#X0909, Dako Cytomation, Carpinteria, California, EE.UU.). La tinción se desarrolló utilizando el kit de sustrato DAB para la peroxidasa (# SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.). Los portaobjetos se montaron con Neo-Mount (#109016, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El tamaño celular se cuantificó con un microscopio de campo brillante. Para cada paciente se cuantificaron 3 campos diferentes por depósito utilizando el programa informático Image J (V1.48).

Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Las muestras de tejido adiposo y aórtico se congelaron instantáneamente en QIAzol (Qiagen, Stanford, CA) y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. El ARN se extrajo usando el kit Micro o Mini RNeasy (Qiagen) y el ácido ribonucleico se convirtió en ADN complementario (kit de transcripción inversa Quantitect - Qiagen). El ADNc de tejido adiposo se sometió a qPCR utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) para *PPAR- γ* (Ensayo ID: Hs01115513_m1), y ciclofilina como gen constitutivo (Ensayo ID Hs04194521_s1). Del mismo modo, el ADNc obtenido a partir de tejido aórtico se sometió a qPCR utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) para *TNF α* (Ensayo ID Hs01113624_g1), *IL6* (Ensayo ID Hs00985639_m1) e *IFN γ* (Ensayo ID Hs00989291_m1), en donde *GAPDH* se utilizaba como gen constitutivo (Ensayo ID Hs02758991_g1). Las reacciones se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos, utilizando 5 ng de ADNc por reacción, en un sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7900HT (Applied Biosystems). La eficiencia de la reacción en cada placa se determinó en base a la pendiente de la curva estándar; la expresión de cada gen de interés en relación con su gen constitutivo se calculó utilizando el método Pfaffl (Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45).

Efectos de la inflamación sobre la diferenciación de preadipocitos primarios pericoronarios (grupo de estudio 2)

Para someter a ensayo si la pared arterial humana de los pacientes con aterosclerosis avanzada secreta mediadores inflamatorios capaces de evitar la diferenciación de los preadipocitos (material aislado a partir de PVAT fijado a la pared vascular) a adipocitos maduros, se recogió tejido aórtico procedente de pacientes sometidos a CABG, y se cultivó en DMEM complementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 20% de FBS. La incubación se realizó utilizando el método de explante de tejido (Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW y Powell JT (1999). Inhibition of prostaglandin E2 synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 100:48-54), en presencia/ausencia de angiotensina II 100 nM durante una semana para inducir la inflamación vascular adicional. Al mismo tiempo, se aislaron preadipocitos del PVAT fijado a la RCA de esos pacientes, mediante la digestión del PVAT durante 45 minutos a 37°C en una solución de colagenasa H (1 mg/ml en PBS). El tejido digerido se centrifugó después a 1200 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en DMEM/F-12 complementado con 10% de FBS y 0,25 ng/ml de FGF humano. Los preadipocitos y el tejido aórtico (+/- angiotensina II) se cultivaron durante 1 semana por separado. Al final de la semana, el tejido aórtico se lavó para eliminar la angiotensina II y se cocultivó con los preadipocitos primarios aislados. Cuando los preadipocitos eran confluentes alrededor del tejido de la aorta, se diferenciaron en DMEM/F12 complementado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM, insulina 100 nM, dexametasona 100 nM, triodo-L-tionina 2 nM (T3), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina, rosiglitazona 1 μM , biotina 33 μM y ácido pantoténico 17 μM , 3% de FBS durante 7 días seguido de medio para el mantenimiento de adipocitos que contenía DMEM/F12 con insulina 10 nM, dexametasona 10 nM durante 2 días (Lee MJ, Wu Y y Fried SK (2012). A modified protocol to maximize differentiation of human preadipocytes and improve metabolic phenotypes. *Obesity (Silver Spring)* 20:2334-40). Se realizó un seguimiento de los adipocitos para vigilar visualmente el tamaño celular y la acumulación de lípidos y mediante tinción con aceite rojo O, seguido por una cuantificación utilizando Image J (versión 1.48) el día 9. En experimentos paralelos, la capacidad del tejido aórtico para expresar citocinas inflamatorias (por ejemplo, *IL6*, *TNF- α* o *IFN- γ* , que luego podrían ejercer un efecto paracrino sobre PVAT), se sometió a ensayo mediante una cuantificación de la expresión de esas citocinas en biopsias de tejido aórtico usando RT-PCR, después de 7 días de cultivo con/sin angiotensina II 100 nM.

Efectos de la inflamación sobre la diferenciación de preadipocitos pericoronarios (grupo de estudio 2)

El efecto directo de la inflamación vascular sobre la capacidad de diferenciación de los adipocitos perivasculares se sometió a ensayo mediante una incubación de los preadipocitos primarios aislados a partir de PVAT de pacientes sometidos a CABG con *TNF- α* recombinante (4 ng/ml), *IL-6* (25 ng/ml) e *IFN- γ* (20 ng/ml), durante una evolución temporal de la diferenciación inducida por DMEM/F12 con IBMX 0,5 mM, insulina 100 nM, dexametasona 100 nM, T3 2 nM, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina, rosiglitazona 1 μM , biotina 33 μM y ácido pantoténico 17 μM , 3% de FBS durante 7 días, seguido de medio para el mantenimiento de adipocitos que contenía DMEM/F12 con insulina 10 nM, dexametasona 100 nM durante 2 días. Para la evolución temporal de la diferenciación, las imágenes se tomaron cada 3 días y se aisló el ARN. El grado de diferenciación de los preadipocitos se estimó mediante a) los cambios en la morfología y el tamaño de los adipocitos, b) la acumulación de gotitas de lípido (teñidas empleando aceite rojo o), c) la expresión de los genes de diferenciación de los adipocitos, es decir, *PPAR- γ* , un marcador de la diferenciación en fase temprana, la proteína CEBPA de unión a CCAAT/potenciador (C/EBP) alfa (*CEBPA*), un marcador de la diferenciación en fase tardía, y la proteína de unión a ácidos grasos 4 (*FABP4*), un marcador de la diferenciación terminal de los adipocitos/adipocitos maduros.

Efectos de la inflamación sobre la proliferación de preadipocitos pericoronarios (grupo de estudio 2)

Preadipocitos humanos aislados a partir de PVAT (AT pericoronario) se cultivaron en placas de 96 pocillos (5 x 10³ células por pocillo) durante 24 h. A continuación, los pocillos pareados se trataron con/sin TNF- α (4 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml) e IFN- γ (20 ng/ml) durante 24 h y 48 h. Se añadieron 20 μ L de un reactivo CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos.

Tinción con aceite rojo O

Brevemente una solución madre de aceite rojo O se había preparado disolviendo 0,3 g de aceite rojo O (Sigma Aldrich) con 100 ml de isopropanol. El día 9 de la evolución temporal de la diferenciación, los adipocitos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se aclararon con agua destilada seguido de 5 minutos de lavado con 60% de isopropanol. Después, las células se tiñeron durante 10 minutos con una solución de aceite rojo O (3 partes de solución madre de aceite rojo O/2 partes de agua) y, finalmente, se lavaron con agua del grifo. Los núcleos se contratiñeron con una solución de hematoxilina. La formación de gotitas de lípidos se observó mediante microscopía de contraste de fase. Para cuantificar la cantidad de gotitas de lípidos acumuladas en los adipocitos maduros, las células teñidas con aceite rojo O se lavaron con una solución de 60% de isopropanol con el fin de extraer el aceite rojo O. La absorbancia del colorante se cuantificó espectrofotométricamente a 500 nm. Para los experimentos de cocultivo de adipocitos con tejido aórtico, la cuantificación del aceite rojo O se realizó usando un análisis de las imágenes de los portaobjetos fijados, utilizando Image J (versión 1.48) en lugar de espectrofotométricamente, para evitar el sesgo de la cuantificación derivado del hecho de que los adipocitos no crecen bajo las muestras de tejido de la aorta, dando lugar a un área de superficie variable de adipocitos en crecimiento por pocillo.

Estudios de tomografía computarizada (Grupos de estudio 1 y 3)

Los participantes en los grupos de estudio 1 y 3 se sometieron a una exploración TC cardíaca en un escáner de 64 cortes (General Electric LightSpeed Ultra, General Electric, Milwaukee, WI, EE.UU.). La vena antecubital media se entubó con una aguja de calibre 21. La frecuencia cardíaca se redujo por debajo de 60 bpm mediante una inyección intravenosa de bloqueadores beta (dosis media de 40 mg de metoprolol IV). También se administró gliceril-trinitrato (800 μ g) por vía sublingual para lograr una vasodilatación coronaria máxima inmediatamente antes de la exploración. Los participantes se sometieron en primer lugar a una exploración TC sin contraste (0,35 s de tiempo de rotación, 2,5 mm de espesor de corte axial, cobertura de detector de 20 mm, intervalo de 20 mm, energía del tubo 120 kVp y 200 mA). La carina se utilizó como el punto de referencia craneal, mientras que el diafragma como el caudal. El campo de visión del pulmón se extendió para cubrir todo el tejido blando torácico (para el análisis del tejido adiposo subcutáneo). Mediante el uso de los mismos puntos de referencia, una exploración por angiografía TC coronaria vino seguida de una inyección intravenosa de 95 ml de medio de contraste a base de yodo (Niopam 370, BRACCO UK Ltd) con una tasa elevada (5 ml/s) y había una purga de 50 ml de solución salina normal al 0,9%. La TC se inició tan pronto como el medio de contraste llenó la aorta ascendente. La energía del tubo de 120 kVp se utilizó en todos los participantes (espesor del corte axial de 0,625 mm, tiempo de rotación de 0,35 s, cobertura del detector de 40 mm, un protocolo de reducción de la dosis del 40% para mA, y mA de referencia ajustado para el tamaño corporal). La adquisición de imágenes prospectivas se utilizó mediante sincronización de ECG en el 70% del ciclo cardíaco (con 100 ms de ventana para una formación de imágenes óptima de la arteria coronaria derecha, si era necesario). Los participantes con artefactos en escalones en la adquisición o una formación de imágenes de RCA subóptimas, fueron excluidos de los análisis.

Caracterización del tejido adiposo mediante TC: Las imágenes reconstruidas se transfirieron al Aquarius Workstation® V.4.4.11 (TeraRecon, Inc., Foster City, CA, EE.UU.) para el análisis volumétrico. El AT se definió como todos los vóxeles dentro de la ventana -190 a -30 UH. Los histogramas de la radiodensidad de los vóxeles se transfirieron y el índice de radiodensidad cuantificada (QR) se definió como la radiodensidad promedio de los vóxeles del volumen de AT de interés (dentro de la ventana preespecificada de -190 a -30 UH) en 3 dimensiones. La hipótesis de trabajo era que el tamaño de los adipocitos es el principal impulsor de la QR (como una proporción mayor de fase lipídica (adipocitos) frente a una fase acuosa (espacio extracelular), y los adipocitos grandes conducirían a una QR más negativa. El EpAT se monitorizó mediante el contorno del saco pericárdico de una manera semiautomatizada (a partir de la bifurcación de la arteria pulmonar en el punto más craneal hasta la punta del corazón en el punto más caudal). El ScAT se monitorizó mediante un muestreo de todo el AT subcutáneo torácico, a la altura del extremo del esternón y que se extendía cranealmente un total de 25 mm. La QR se calculó en EpAT y ScAT a partir de imágenes 3D reconstruidas utilizando una versión en desarrollo del programa informático Aquarius (TeraRecon, Inc., V.4.4.11), desarrollado en el marco del programa de investigación actual. Las exploraciones de pacientes en el Grupo de Estudio 1 se realizaron con y sin un agente de contraste, para acceder al impacto del agente de contraste sobre los valores absolutos de la QR medida.

Caracterización del tejido adiposo pericoronario: una reconstrucción multiplanar, curvada 3D se utilizó para definir el segmento vascular de interés y para analizar el tejido perivasculoso. La arteria coronaria derecha (RCA) se utilizó para realizar la formación de imágenes de tejido adiposo pericoronario, ya que esta arteria coronaria no tiene ramas principales y PVAT / no PVAT se puede definir fácilmente. El primer 1 cm de la RCA proximal se omitió del

análisis para excluir del análisis el tejido adiposo que se encontraba cerca del orificio coronario/raíz aórtica. A continuación, un segmento de 4 cm de longitud de la RCA (del 10° mm al 50° mm desde el orificio coronario derecho) se monitorizó de forma automatizada. Las capas internas y externas del análisis se ajustaron manualmente para realizar un seguimiento de los límites del lumen y de la pared exterior, respectivamente. A continuación, el tejido perivascular se segmentó de una manera semiautomatizado en 20 capas concéntricas cilíndricas de 1 mm de espesor, alrededor de la pared vascular exterior. La QR se calculó para cada una de las veinte capas de tejido. Las curvas de radiodensidad promedio del AT se representaron gráficamente frente a la distancia radial desde la pared vascular externa.

QR en PVAT: No existe una definición biológica clara de PVAT, así que para los estudios de formación de imágenes, PVAT se define como la radiodensidad del tejido adiposo en una capa de tejido dentro de una distancia radial desde la pared externa de la arteria coronaria que es igual al diámetro promedio del segmento de RCA del seguimiento. La radiodensidad no PVAT se definió en la capa concéntrica más distal del AT desde la pared de la RCA. El Índice de Caracterización Volumétrica Perivascular (VPCI) se calculó a continuación, como la diferencia de QR en PVAT con QR en no PVAT (a 2 cm de distancia desde la pared externa de la RCA), como se ha definido anteriormente.

Puntuación del calcio coronario: La puntuación del calcio coronario (CCS) se midió en Aquarius Workstation® para todas las arterias coronarias y para RCA por separado, mediante el cálculo de la puntuación de Agatston (Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Jr. y Detrano R (1990). Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 15:827-32).

Análisis de la placa coronaria usando CTA: Para el análisis de la morfología de la placa vascular, se adaptaron los umbrales de UH previamente sugeridos (Obaid DR, Calvert PA, Gopalan D, Parker RA, Hoole SP, West NE, Goddard M, Rudd JH y Bennett MR (2013). Atherosclerotic plaque composition and classification identified by coronary computed tomography: assessment of computed tomography-generated plaque maps compared with virtual histology intravascular ultrasound and histology. *Circ Cardiovasc Imaging* 6:655-64). Un cartografiado de las UH de la pared de la arteria coronaria derecha se utilizó para cuantificar el volumen de la placa fibrosa (65 a 265 UH). El índice de placa fibrosa se calculó como la relación del volumen de la placa fibrosa frente al volumen total del vaso.

Exploraciones con TC de explantes de tejido adiposo

Muestras congeladas de tejido ScAT, ThAT y EpAT de todos los pacientes en el grupo de estudio 1 se exploraron mientras que estaban congeladas sobre hielo seco, para evaluar la capacidad de la QR para describir la biología del tejido adiposo. Explantes de tejido adiposo se exploraron en un escáner de TC para 320 cortes de Toshiba Aquilion One, usando una adquisición helicoidal de doble energía con 135 keV y 80 keV, 50 mA, 0,5 s de tiempo de rotación, 0,5 mm de espesor de corte, y la reconstrucción de imágenes a 120 keV para el análisis de QR. En 105 de estos pacientes se realizaron exploraciones CT por parejas (exploraciones *in vivo* así como exploraciones de explantes de tejido de los mismos sitios anatómicos/depositos), para validar el modelo de formación de imágenes con TC *in vitro* frente a la formación de imágenes *in vivo*, y para permitir el uso de este modelo para entender el valor biológico de la QR en el estudio de AT humano.

Análisis estadístico

Las variables continuas se sometieron a ensayo para determinar la distribución normal mediante el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables no distribuidas normalmente se transformaron logarítmicamente para el análisis y se presentan como mediana [percentil 25° -75°]. Las variables distribuidas normalmente se presentan como media \pm SEM.

Las comparaciones de las características entre los diferentes grupos de pacientes se realizaron usando la prueba t no pareada para 2 grupos o ANOVA de una vía para 3 grupos. Para las comparaciones de las diferencias de tamaño de los adipocitos y la expresión de genes específicos en PVAT y no PVAT pareados en la Figura 4, se empleó la prueba de rangos pareados de Wilcoxon. Las diferencias entre los grupos en el cambio de QR a lo largo de la distancia desde la RCA (Figura 4I), se estudió usando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, con la interacción (distancia desde la pared exterior de la RCA) x (grupo). Para las diferencias entre los grupos en las evoluciones temporales de la diferenciación de los adipocitos, se utilizó ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, con la interacción (tiempo) x (grupo).

Las variables categóricas se compararon utilizando la prueba de chi cuadrado, si era apropiado. Las correlaciones entre las variables continuas se evaluaron mediante el uso de un análisis bivariante, y se estimó como apropiado el coeficiente r de Pearson o rho de Spearman. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando SPSS v20.0 y P<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Tabla 1: Características demográficas de los participantes en el estudio

ES 2 719 443 T3

	Grupo de estudio 1		Grupo de estudio 2 (estudios ex vivo)
	<i>Todos (explantes CT AT)</i>	<i>CCTA (in vivo)</i>	
Participantes (n)	453	105	37
Edad (años)	66,8±0,49	65,0±0,97	65,4±1,54
Género masculino (%)	80,8	86,9	78,4
Hipertensión (%)	70,9	74,8	70,3
Hiperlipidemia (%)	75,5	88,8	86,5
Diabetes de tipo 2 (%)	24,1	28,2	13,5
Fumador (ex/activo) (%)	53,0/11,3	51,4/12,1	62,2/5,4
IMC (Kg/m ²)	28,4±0,2	28,7±0,4	29,21±0,7
Colesterol (mg/dl)	4,35±0,18	5,2±0,5	185,6±12,8
Glucosa (mg/dl)	111,8±2,16	113,9±4,6	98,3±10,2
Insulina (µU/ml)	11,0±1,5	11,5±2,9	6,8±1,1
HOMA-IR	3,67±0,63	3,5±1,4	1,95±0,5
HDL (mg/dl)	1,19±0,06	1,08±0,06	50,27±4,8
Medicación (%)			
ACEi	48,5	45,8	40,5
ARBs	14,3	17,8	13,5
Beta bloqueantes	64,8	74,8	75,7
Aspirina/Clopidogrel	79,2/24,0	86,0/37,4	86,5/27,0
Estatinas	80,8	86,9	83,8
CCBs	26,8	31,8	18,9

CCTA: Angiografía con tomografía computarizada coronaria; CAD: enfermedad arterial coronaria; ACEi: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARBs: bloqueadores de los receptores de angiotensina; CCBs: bloqueadores de los canales de calcio. HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; HDL: lipoproteína de alta densidad; IMC: índice de masa corporal

Tabla 2: Características demográficas de los participantes del estudio en el grupo de estudio 3

	Grupo de estudio 3	
	<i>no CAD</i>	<i>CAD</i>
Participantes (n)	117	156
Edad (años)	58,6±1,0	64,5±0,8*
Género masculino (%)	51,3	8,3,*
Hipertensión (%)	33,0	71,1*
Hiperlipidemia (%)	25,5	78,2*
Diabetes de tipo 2 (%)	8,5	29,4*
Fumador (ex/activo) (%)	21,6/1,9	42,3/9,9*
IMC (Kg/m ²)	29,5±2,3	28,7±0,5
Medicación (%)		

	Grupo de estudio 3	
	no CAD	CAD
ACEi	5,1	37,8*
ARBs	3,4	14,7*
Beta bloqueantes	16,2	62,2*
Aspirina/Clopidogrel	16,7/0	78,4/26,3*
Estatinas	17,9	77,7*
CCBs	7,7	24,4*

CAD: enfermedad arterial coronaria; ACEi: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARBs: bloqueadores de los receptores de angiotensina; CCBs: bloqueadores de los canales de calcio. IMC: índice de masa corporal; **P <0,01 frente a no CAD

Resultados

Caracterización del estado de diferenciación de los adipocitos y el tamaño celular en diferentes depósitos de tejido adiposo

5 En primer lugar, se estudiaron las diferencias fenotípicas entre EpAT, ThAT y ScAT obtenidos a partir de 453 pacientes sometidos a cirugía cardíaca (Grupo de estudio 1, Tabla 1). EpAT y ThAT tenían adipocitos significativamente más pequeños en comparación con ScAT, reflejando una mala diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros grandes (Figura 13A-D). De hecho, el mal estado de diferenciación de los adipocitos en EpAT / ThAT en comparación con ScAT, se documentó con la expresión significativamente menor de *PPAR-γ* (que caracteriza los primeros estadios de la diferenciación de adipocitos (Ntambi JM y Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S), Figura 13E), *CEBPA* (que caracteriza el estadio tardío de la diferenciación de adipocitos (Ntambi JM y Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S), Figura 13E) y *FABP4* (expresado solamente en los adipocitos grandes, maduros, (Ntambi JM y Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S) Figura 13G). De este modo, la expresión de estos marcadores de la diferenciación de adipocitos en el tejido adiposo se podría utilizar como un marcador del tamaño promedio de los adipocitos.

Efectos de la inflamación vascular sobre el estado de diferenciación de los adipocitos en tejido adiposo humano pericoronario

20 Teniendo en cuenta nuestros estudios recientes en humanos (Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, Shirodaria C, Sayeed R, Petrou M, De Silva R, Jalilzadeh S, Demosthenous M, Bakogiannis C, Tousoulis D, Stefanadis C, Choudhury RP, Casadei B, Channon KM y Antoniades C (2013). Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation* 127:2209-21, y Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, Shirodaria C, Psarros C, Herdman L, Sanna F, De Silva R, Petrou M, Sayeed R, Krasopoulos G, Lee R, Digby J, Reilly S, Bakogiannis C, Tousoulis D, Kessler B, Casadei B, Channon KM y Antoniades C (2014). Adiponectin As A Link Between Type 2 Diabetes Mellitus And Vascular NADPH-Oxidase Activity In The Human Arterial Wall: The Regulatory Role Of Perivascular Adipose Tissue. *Diabetes* 64(6):2207-19) y una evidencia adicional procedente de estudios en animales (Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R y Sata M (2010). Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1576-82) que sugieren que los adipocitos en PVAT "detectan" procesos proaterogénicos que suceden en la pared vascular subyacente que modifican su biología, se asume que las señales inflamatorias procedentes de la pared arterial humana se pueden difundir en el tejido adiposo perivascular, lo que afecta al estado de diferenciación de los adipocitos locales y al tamaño. Como las muestras de arteria coronaria humana no se pueden obtener para investigación, se utilizó tejido aórtico recogido durante una cirugía CABG ("botones" aórticos obtenidos a partir del punto de anastomosis de un injerto en la aorta ascendente de pacientes en el grupo de estudio 2, Tabla 1) como sistema modelo, el cual se cultivó *ex vivo* durante una semana en presencia o ausencia de angiotensina II (para inducir una inflamación vascular adicional) (Figura 14A) (Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW y Powell JT (1999). Inhibition of prostaglandin E2 synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 100:48-54). Al final de esa semana, el tratamiento con angiotensina II era capaz de regular al alza la expresión de las citocinas inflamatorias IL-6, TNF-α e IFN-γ en el tejido aórtico (Figura 14B). Después de esa primera semana en cultivo, se lavó el tejido aórtico para eliminar la angiotensina II y se cocultivó con los preadipocitos recogidos a partir del mismo paciente, seguido de una inducción de la diferenciación de los adipocitos a adipocitos maduros utilizando una metodología bien establecida (Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK y O'Rahilly S (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-

specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100: 3149-53). Se observó que los adipocitos cultivados con tejido aórtico pretratado con angiotensina II tenían una diferenciación más lenta a adipocitos maduros que en comparación con los preadipocitos cultivados en ausencia de tejido aórtico, mientras que los preadipocitos cocultivados con tejido aórtico no estimulado tenían un estado de diferenciación intermedia (Figura 14), lo que sugiere que los mediadores liberados desde la pared vascular humana "inflamada" pueden ejercer efectos paracrinos sobre el PVAT vecino, evitando la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros.

Con el fin de explorar si los mediadores inflamatorios (producidos en la pared vascular) modifican directamente la capacidad de los preadipocitos del PVAT para diferenciarse, a continuación se expusieron preadipocitos humanos recogidos a partir de PVAT a una combinación de IL-6, TNF- α e IFN- γ y se indujo su diferenciación. Se observó que estas citocinas tenían un efecto inhibitor notable sobre la capacidad de los preadipocitos para diferenciarse a adipocitos maduros, tal y como se observó visualmente durante la evolución temporal de la diferenciación (Figura 19), y se documentó por una acumulación intracelular más baja de gotitas de lípidos (tinción con aceite rojo O, Figuras 16A-D) cuantificada usando un ensayo fotométrico (Figura 16E). El impacto de estas citocinas sobre la capacidad de los preadipocitos para diferenciarse, se confirmó después mediante una cuantificación de la expresión de *PPAR γ* (Figura 16G), *CEBPA* (Figura 16H) y *FABP4* (Figura 16I) durante la evolución temporal de la diferenciación. Las mismas citocinas también aceleraban significativamente la tasa de proliferación de los preadipocitos humanos, evaluados usando el ensayo MTS (Figura 16F). Estos hallazgos apoyan la idea de que las citocinas inflamatorias procedentes de los vasos pueden inducir una proliferación e inhibir la diferenciación de los preadipocitos humanos en el tejido adiposo perivascular circundante, de una manera paracrina. Por lo tanto, si se desarrollan herramientas no invasivas para realizar un seguimiento de estos cambios fenotípicos del PVAT impulsados por una inflamación vascular, se puede identificar una inflamación en las arterias coronarias de forma no invasiva.

Evaluación del estado de diferenciación de los adipocitos empleando tomografía computarizada

El equilibrio entre la fase de lípido y la acuosa del tejido adiposo se refleja por el tamaño de los adipocitos (Di Girolamo M y Owens JL (1976). Water content of rat adipose tissue and isolated adipocytes in relation to cell size. *Am J Physiol* 231:1568-72). Para explorar si la radiodensidad promedio del TC del tejido adiposo (representado por el índice de QR descrito anteriormente) proporciona un marcador del estado/tamaño de diferenciación de los adipocitos, se cuantificó la QR en explantes de EpAT, ThAT y ScAT obtenidos a partir de 453 pacientes sometidos a cirugía cardíaca (grupo de estudio 1). Había una asociación inversa sorprendente entre la QR y el grado de diferenciación de los adipocitos, tal y como se definía por la expresión de *CEBPA* y *FABP4* en las mismas muestras (Figura 17A-F). También había una fuerte asociación inversa entre la QR de explantes de tejido adiposo y el tamaño de los adipocitos cuantificados por histología (Figura 17G). Por consiguiente, había una seguridad de que la QR se podía utilizar como un marcador de la variación de la diferenciación y el tamaño de los adipocitos en diferentes depósitos de tejido adiposo (es decir, cuanto mayor es la diferenciación/tamaño de los adipocitos, más lipófilo es el contenido del tejido, por lo tanto más negativa es la QR). Para considerar esta hipótesis *in vivo*, se realizaron exploraciones TC en un grupo de 105 pacientes de los que se habían tomado imágenes de explantes de tejido adiposo *ex vivo* (del grupo de estudio 1). Se observó una fuerte correlación entre la QR obtenida *in vivo* y la QR respectiva medida en los explantes del mismo tejido de esos pacientes (Figura 17H e I).

Para validar adicionalmente la capacidad de la QR para estimar el estado de diferenciación de los adipocitos (por lo tanto, el tamaño de los adipocitos) *in vivo*, se correlacionaron los valores de la QR *in vivo* para EpAT y ScAT a partir de exploraciones TC de 105 pacientes (como se ha descrito anteriormente), con la expresión de marcadores de la diferenciación de adipocitos. Se observó que la QR *in vivo* estaba fuertemente relacionada con la expresión tanto de *CEBPA* (Figura 18A y B) como de *FABP4* (Figura 18C y D) en los respectivos depósitos de tejido adiposo de esos pacientes. La QR de EpAT *in vivo* era significativamente mayor que en comparación con la QR de ScAT *in vivo* (Figura 18E), confirmando que las diferencias demostradas histológicamente en el estado de diferenciación de depósitos de tejido adiposo, conduce a diferencias respectivas en la QR *in vivo*. Curiosamente, HOMA-IR se asoció positivamente con la QR de ScAT *in vivo*, pero no con la QR de EpAT (Figura 18F), lo que sugiere que un estado metabólico sistémico está ligado al estado de diferenciación/tamaño de los adipocitos en ScAT, mientras que en EpAT está muy regulado por estímulos locales, en lugar de estímulos sistémicos.

Consideraciones técnicas: Dado que las exploraciones TC se realizan rutinariamente usando un agente de contraste, a continuación, se exploró el posible impacto del agente de contraste sobre las imágenes de QR obtenidas *in vivo*, y se documentó una fuerte relación lineal entre la QR obtenida a partir de imágenes con y sin la administración de un agente de contraste (Figura 15). Debido a la alta heterogeneidad histológica regional de ThAT, no era posible una coincidencia significativa de las imágenes de TC *in vivo* con las características biológicas de las respectivas biopsias de tejidos. Por lo tanto, la QR tal y como se ha descrito hasta ahora, proporciona un marcador fiable del estado de diferenciación/tamaño de los adipocitos *in vivo* solo en EpAT y ScAT.

Visualización de los cambios de tamaño/estado de diferenciación de los adipocitos en el tejido adiposo pericoronario *in vivo*

Para investigar la relación entre la QR y el tamaño/estado de diferenciación de los adipocitos alrededor de las arterias coronarias humanas, se comparó el tejido adiposo inmediatamente adyacente a la arteria coronaria derecha (RCA) con tejido adiposo a 2 cm de distancia de la RCA, no en proximidad de ninguna rama coronaria epicárdica

visible, a partir de pacientes sometidos a CABG en el grupo de estudio 2. En primer lugar, se observó que la expresión de *PPAR-γ*, *CEBPA* y *FABP4* se regulaba a la baja significativamente más cerca de la RCA (Figura 20A-C). Del mismo modo, el tamaño de los adipocitos era significativamente menor en la proximidad de la arteria coronaria derecha que en comparación con el tamaño de los adipocitos a 2 cm de distancia de la pared vascular (Figura 20D). Estas observaciones confirmaron nuestros hallazgos procedentes de experimentos *ex vivo* e *in vitro*, mostrando que las señales inflamatorias procedentes de la arteria coronaria humana enferma evitan la diferenciación de los preadipocitos en el PVAT adyacente a la misma, creando un gradiente de este efecto en el tejido adiposo que rodea el árbol arterial coronario. Para examinar si se podría realizar un seguimiento de estos cambios morfológicos del PVAT como respuesta a una inflamación coronaria mediante la formación de imágenes con TC no invasiva, se utilizaron nuestras herramientas de análisis por formación de imágenes, desarrolladas recientemente, para analizar imágenes angiográficas de la TC de una cohorte clínica adicional de 273 sujetos en el grupo de estudio de 3 (156 con y 117 sin aterosclerosis coronaria significativa, grupo de estudio 3). Se cuantificó la QR alrededor del segmento proximal de la arteria coronaria derecha, en capas cilíndricas 3D de 1 mm de espesor, desde las directamente adyacentes a la pared vascular, avanzando hasta a 20 mm de distancia de la pared vascular (Figura 20E-H). Se observó una disminución progresiva de la QR a valores más negativos al avanzar desde cerca del vaso hasta el tejido adiposo más alejado del mismo (Figura 20I), confirmando que la QR hace un seguimiento preciso de los cambios en el tamaño de los adipocitos y el estado de diferenciación. Es importante destacar que las relaciones entre la QR y la distancia desde la pared vascular eran significativamente diferentes en pacientes con aterosclerosis coronaria que en comparación con individuos sanos, lo que muestra que valores más bajos de la QR cerca de la pared vascular de individuos sanos son compatibles con adipocitos más grandes, más diferenciados (Figura 20A-I). Esto sugiere que los cambios observados de la QR, en realidad podrían caracterizar el grado de inflamación vascular en el interior de las arterias coronarias humanas, de forma detectable usando un enfoque novedoso, no invasivo *in vivo*.

Validación de QR y VPCI frente a biomarcadores establecidos de formación de imágenes con valor predictivo clínico

Para validar la QR frente a biomarcadores establecidos de formación de imágenes con un valor predictivo clínico conocido, se cuantificó la CCS (en la RCA y globalmente en el árbol coronario completo) y el índice de placa fibrosa en la RCA, en los 273 individuos en el grupo de estudio 3. Había una correlación significativa entre la QR y la puntuación de calcio (Figura 21A y B), pero la capacidad de la QR para discriminar sujetos con calcio no detectable de aquellos con calcio detectable pero bajo nivel, era bastante limitada. El VPCI (el gradiente de QR desde PVAT a no PVAT) era superior como biomarcador en la identificación de sujetos con una puntuación intermedia de calcio coronario (de forma total (Figura 21C) o específica en la RCA (Figura 21D)). Es importante destacar que, tanto la QR como el VPCI estaban fuertemente relacionados con el índice de placa fibrosa de la RCA subyacente (Figura 21E y F).

REIVINDICACIONES

1. Un método de caracterización volumétrica de tejido perivascular empleando datos recogidos a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de cierta longitud de un vaso sanguíneo, comprendiendo el método:
- cuantificar la radiodensidad en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular; y
- 5 determinar si uno o varios de los valores de la radiodensidad cuantificada están por encima o por debajo de un valor de referencia de la radiodensidad; y comprendiendo el método adicionalmente
- determinar una representación gráfica del factor multiplicativo de cambio en la radiodensidad cuantificada en relación con la radiodensidad de referencia en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular con respecto a la distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo hasta una distancia final;
- 10 determinar el área de la región unida por la representación gráfica del factor multiplicativo de cambio en la radiodensidad cuantificada y una representación gráfica de la radiodensidad de referencia con respecto a una distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo hasta la distancia final; y
- 15 dividir dicha área por la radiodensidad cuantificada medida a una distancia desde la pared exterior del vaso sanguíneo, en donde la distancia es menor que el radio del vaso o es una distancia desde la superficie exterior del vaso, por encima de la cual la radiodensidad cuantificada del tejido adiposo disminuye más de un 5% en comparación con la radiodensidad de referencia del tejido adiposo en un vaso del mismo tipo exento de enfermedad.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la radiodensidad se cuantifica para el tejido adiposo en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular, o
- 20 en el que la radiodensidad se cuantifica para el agua en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular.
3. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que los datos se obtuvieron a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de cierta longitud de la arteria coronaria derecha, la arteria descendente anterior izquierda, la arteria circunfleja izquierda, la aorta, las arterias carótidas o las arterias femorales, preferiblemente
- 25 en donde los datos se obtuvieron a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de una longitud de 4 cm, comenzando a 1 cm distalmente del origen de la arteria coronaria derecha.
4. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los datos se obtuvieron a partir de una exploración por tomografía computarizada a lo largo de cierta longitud de la aorta.
- 30 5. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la radiodensidad se cuantifica en unidades Hounsfield.
6. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular tiene un espesor de 1 mm.
- 35 7. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular se extiende hasta una distancia final desde la pared exterior del vaso sanguíneo, siendo la distancia final el punto en el que la radiodensidad del tejido adiposo alcanza un valor mínimo dentro de la zona anatómica explorada en un vaso sano o disminuye $\geq 10\%$ frente al valor de la radiodensidad de referencia, en un vaso del mismo tipo exento de enfermedad, preferiblemente
- 40 en el que cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular se extiende hasta una distancia final de 10 mm desde la pared exterior del vaso sanguíneo, o
- en el que cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular se extiende hasta una distancia final de 20 mm desde la pared exterior del vaso sanguíneo.
- 45 8. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que el valor de la radiodensidad de referencia es la radiodensidad promedio cuantificada en una capa de tejido perivascular que se encuentra dentro de la primera capa concéntrica de 1 mm de espesor que rodea la pared exterior del vaso sanguíneo, preferiblemente
- (i) en donde la radiodensidad de referencia es la radiodensidad cuantificada para el tejido adiposo en una capa de tejido perivascular que se encuentra de forma proximal a la pared exterior del vaso sanguíneo, o
- 50 (ii) en donde la radiodensidad de referencia es la radiodensidad cuantificada para el agua en una capa de tejido perivascular que se encuentra de forma proximal a la pared exterior del vaso sanguíneo.

9. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la radiodensidad cuantificada o de referencia es una radiodensidad promedio.
10. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la radiodensidad cuantificada es la radiodensidad cuantificada de tejido adiposo en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular, o
- 5 en el que la radiodensidad cuantificada es la radiodensidad cuantificada de agua en cada una de una o varias capas concéntricas de tejido perivascular.
11. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la radiodensidad cuantificada es una radiodensidad promedio, y/o
- 10 en donde la distancia final es el punto en el que la radiodensidad del tejido adiposo alcanza un valor mínimo dentro de la zona anatómica explorada en un vaso sano o disminuye $\geq 10\%$ por debajo del valor de la radiodensidad de referencia, en un vaso del mismo tipo exento de enfermedad, preferiblemente
- en donde la distancia final es de 10 mm, o
- en donde la distancia final es de 20 mm.
12. El método según cualquier reivindicación precedente, que comprende además:
- 15 restar la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular de la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular situado a una distancia igual al radio del vaso alrededor de la pared exterior del vaso sanguíneo, preferiblemente
- (i) en donde la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular es la radiodensidad cuantificada de tejido adiposo en la capa de tejido perivascular, preferiblemente
- 20 en donde la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular es la radiodensidad cuantificada de tejido adiposo en la capa de tejido no perivascular; o
- (ii) en donde la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular es la radiodensidad cuantificada de agua en la capa de tejido perivascular, y/o
- 25 en donde la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular es la radiodensidad cuantificada de agua en la capa de tejido no perivascular.
13. El método según la reivindicación 12, en el que la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular es una radiodensidad promedio, o
- en el que la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular es una radiodensidad promedio.
14. El método según las reivindicaciones 12 o 13, en el que la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular es la radiodensidad medida en una capa de tejido no perivascular situado a una distancia mayor que el radio promedio del vaso alrededor de la pared exterior del vaso sanguíneo, o
- 30 en el que la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular es la radiodensidad medida en una capa de tejido no perivascular situado a una distancia igual a tres veces el radio promedio del vaso alrededor de la pared exterior del vaso sanguíneo.
- 35 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende además asignar el valor determinado de la diferencia entre la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido perivascular y la radiodensidad cuantificada en una capa de tejido no perivascular a una escala que tiene un umbral inferior y un umbral superior, preferiblemente
- (i) en donde el umbral inferior es el valor entre el tercil inferior y el intermedio, preferiblemente
- 40 en donde el umbral inferior es 2; o
- (ii) en donde el umbral superior es un valor entre el tercil intermedio y el superior, preferiblemente
- en donde el umbral superior es 8.

Figura 1

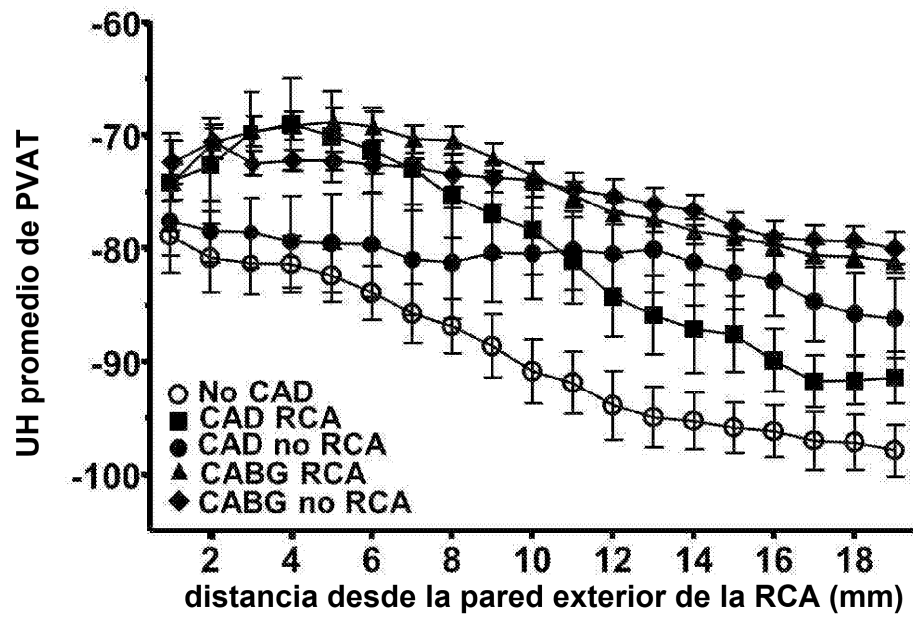


Figura 2

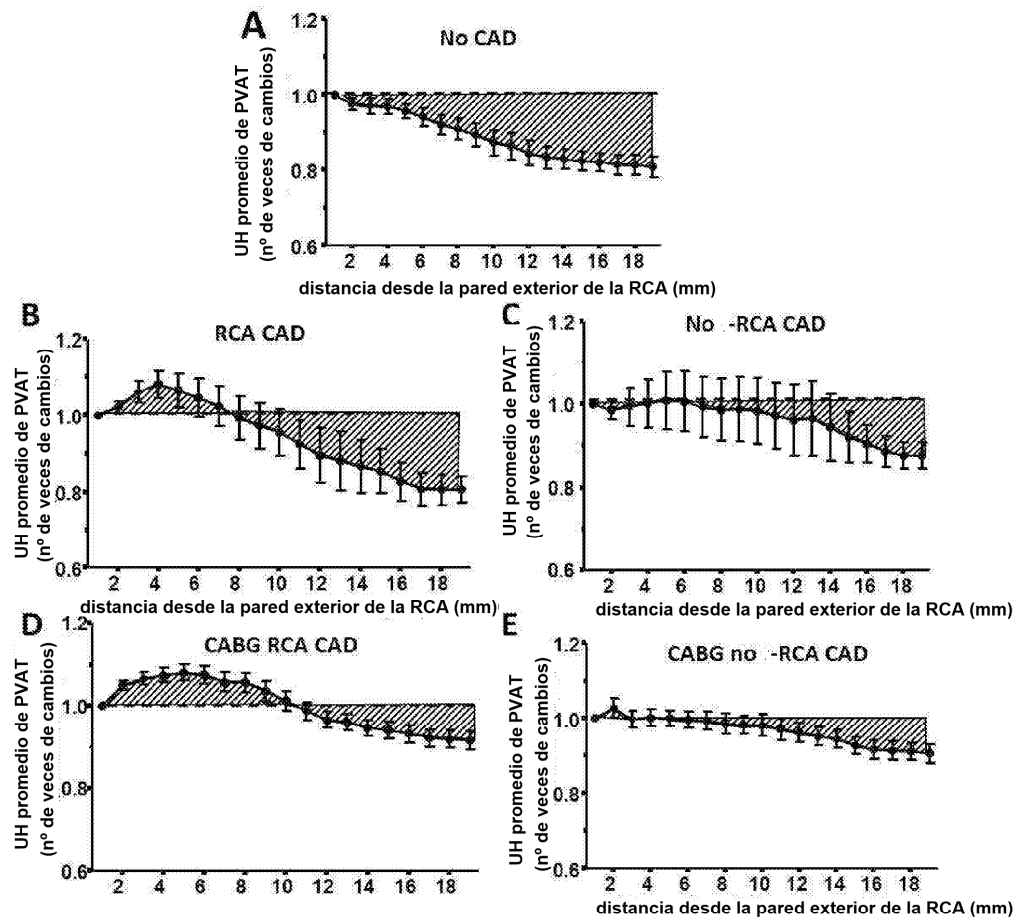


Figura 3

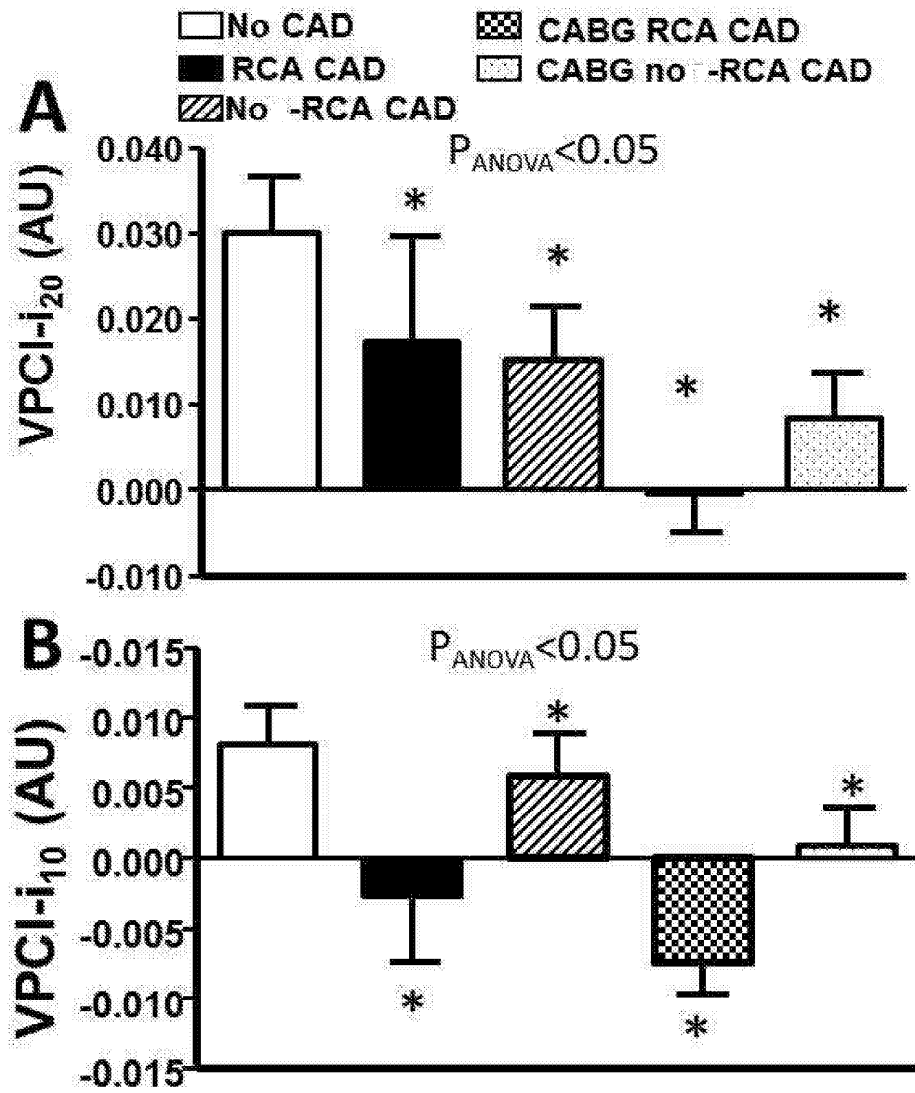


Figura 4

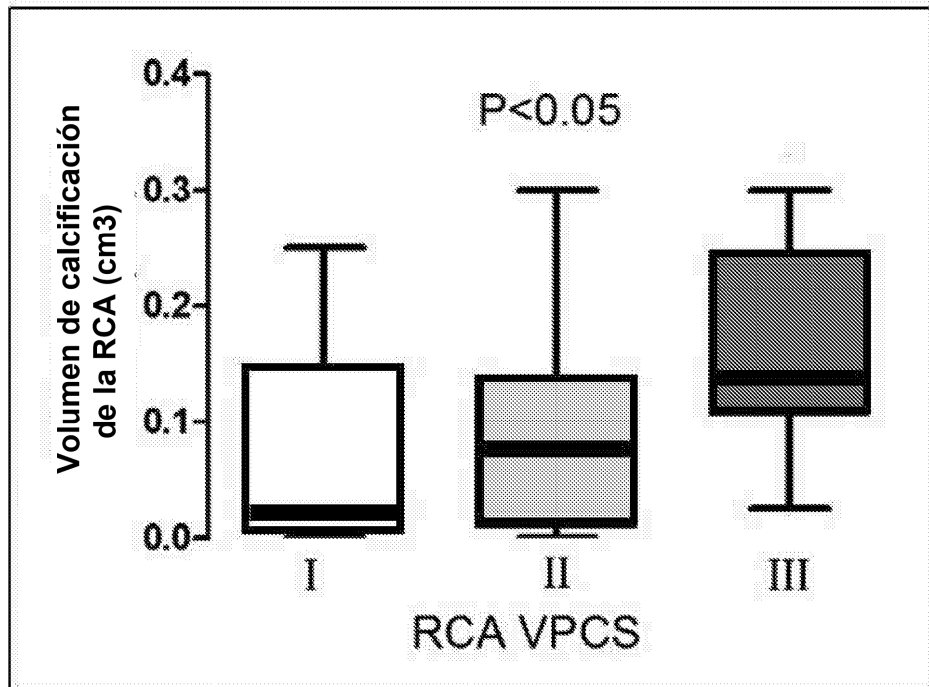


Figura 5

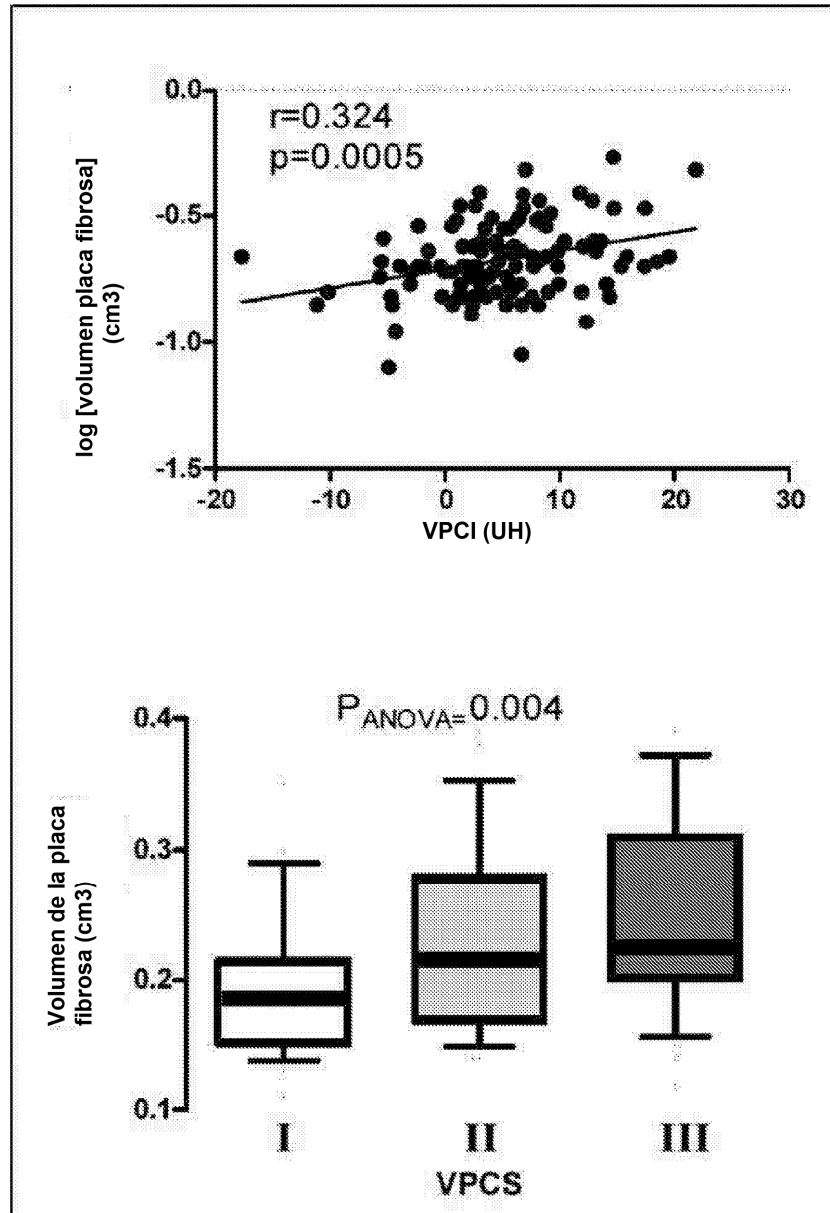


Figura 6

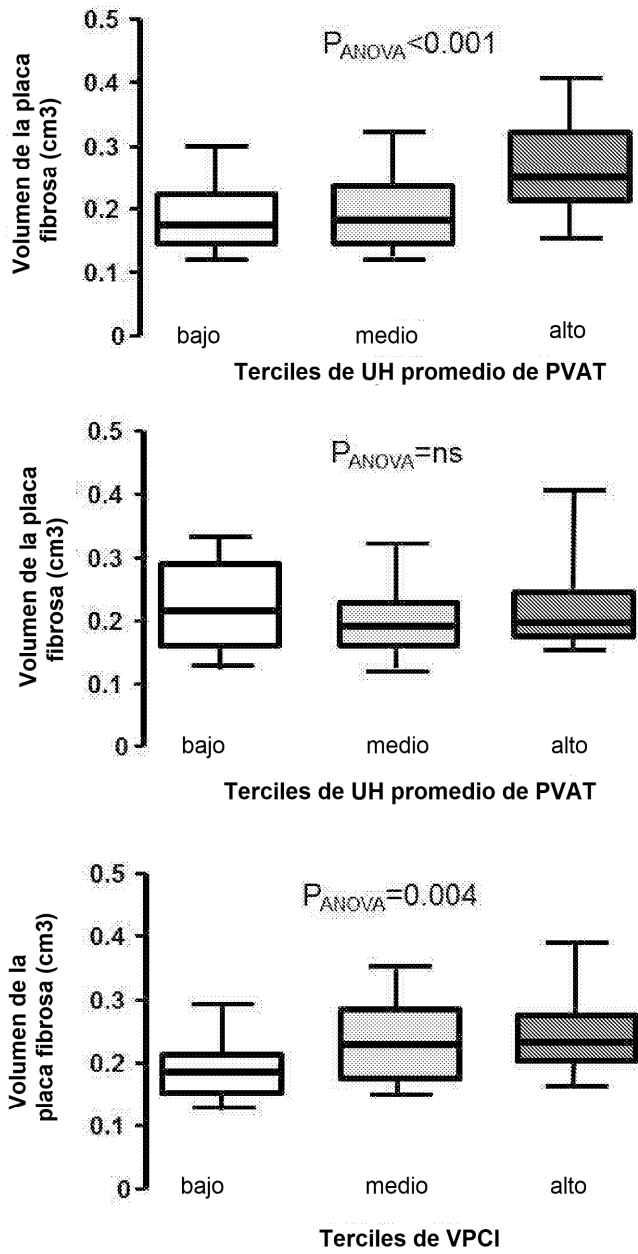


Figura 7

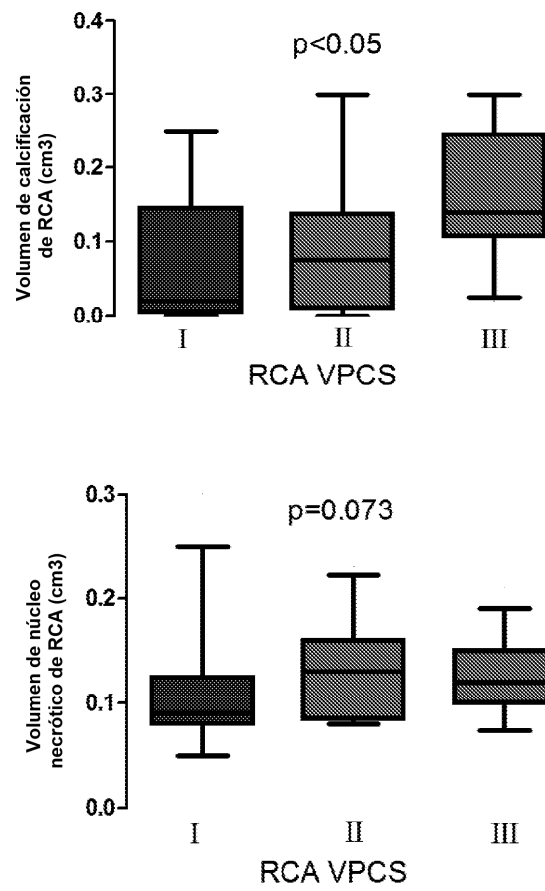


Figura 8

Arteria coronaria derecha

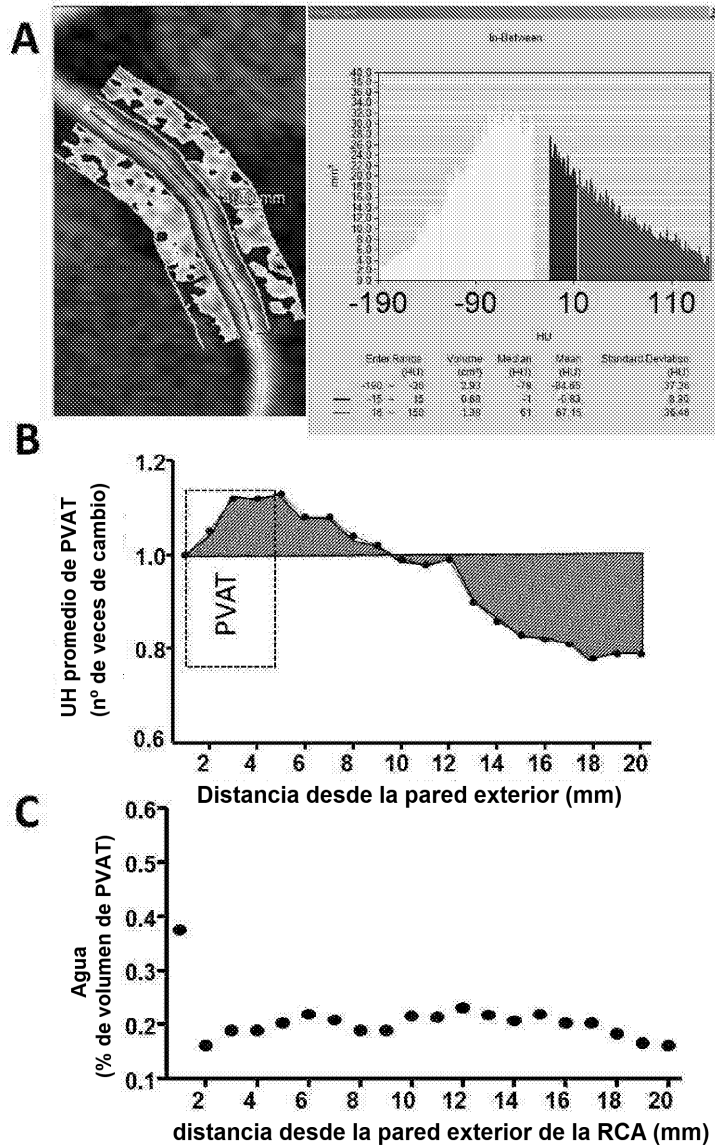


Figura 9

Arteria coronaria descendente anterior izquierda

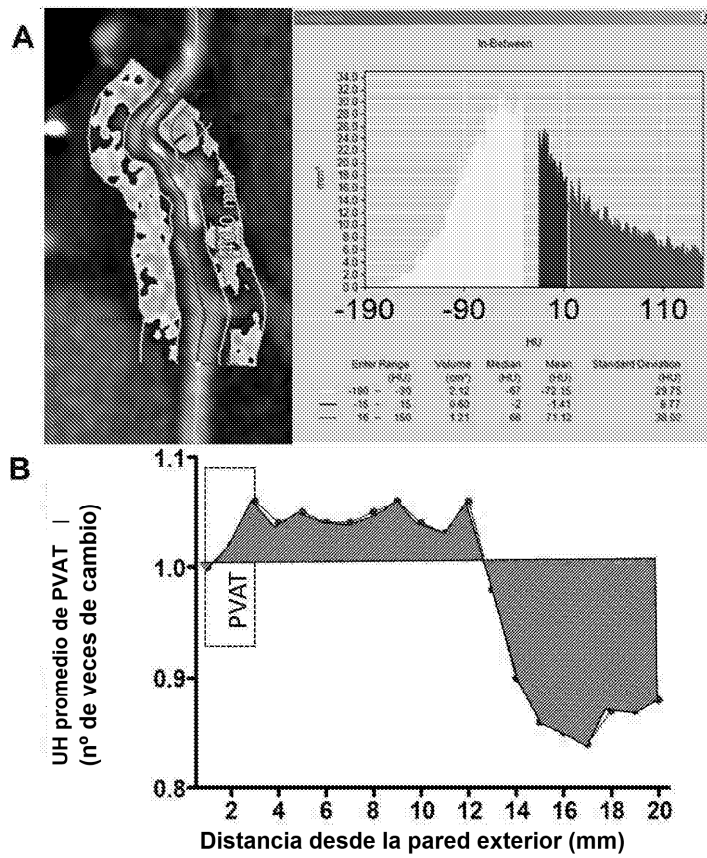


Figura 10

Arteria coronaria circunfleja izquierda

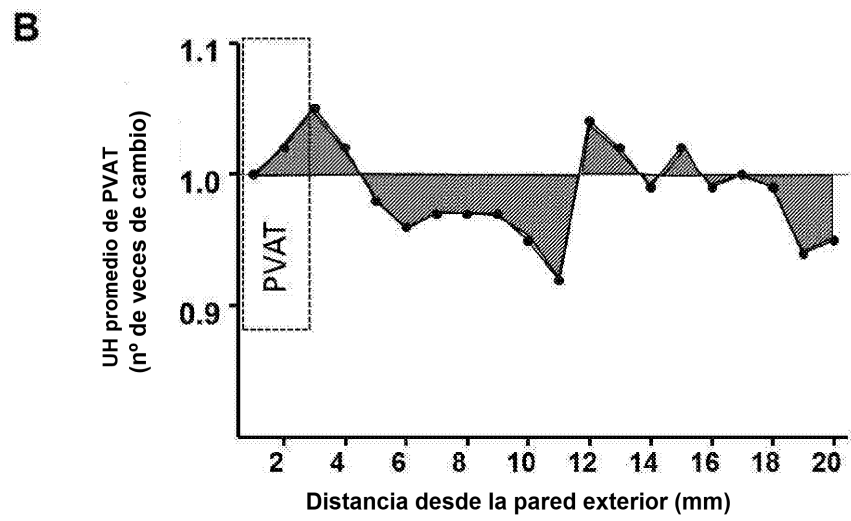
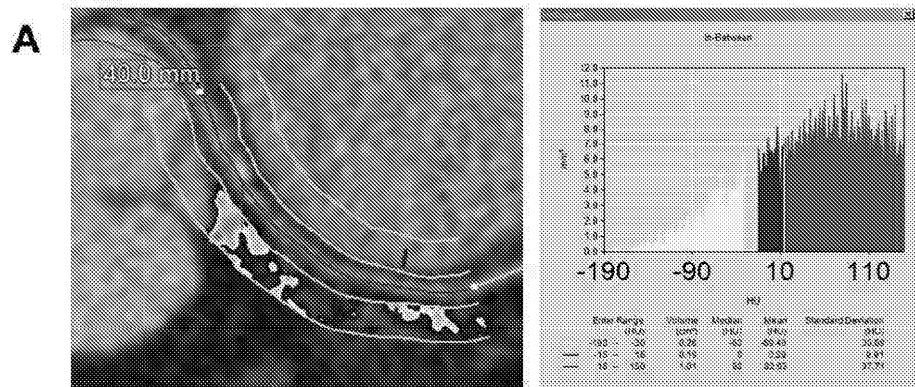


Figura 11

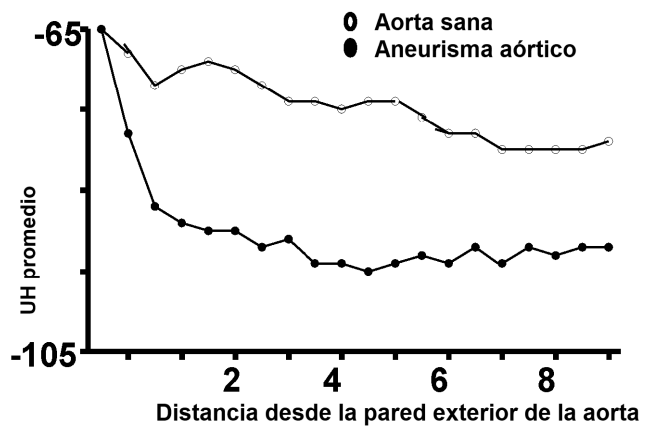
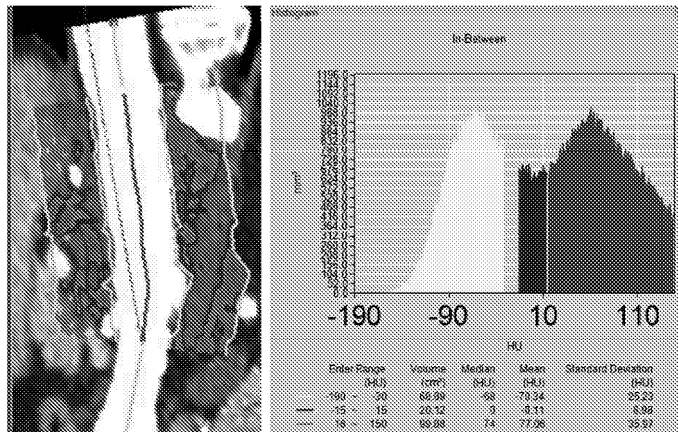


Figura 12

Arteria femoral

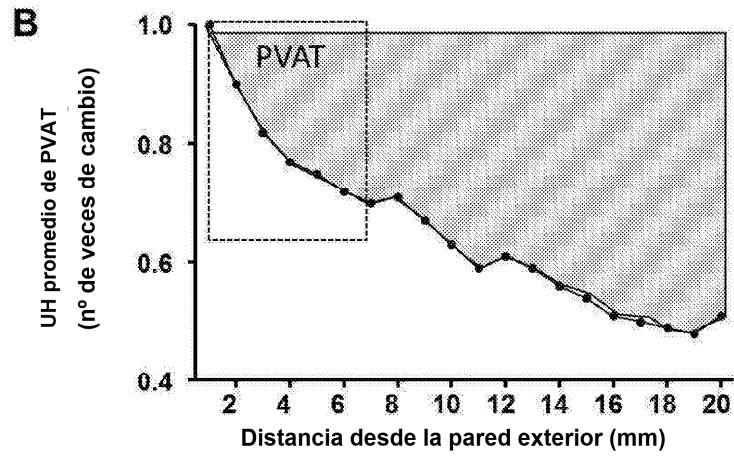
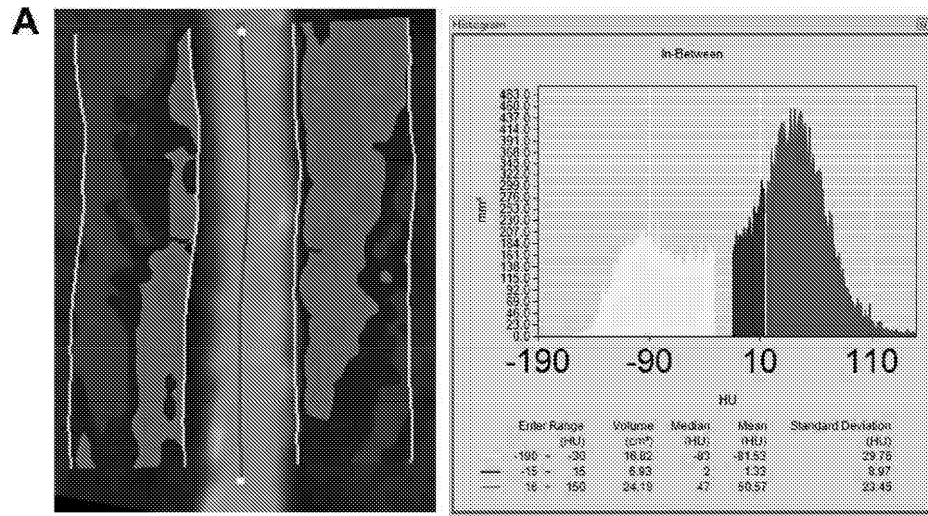
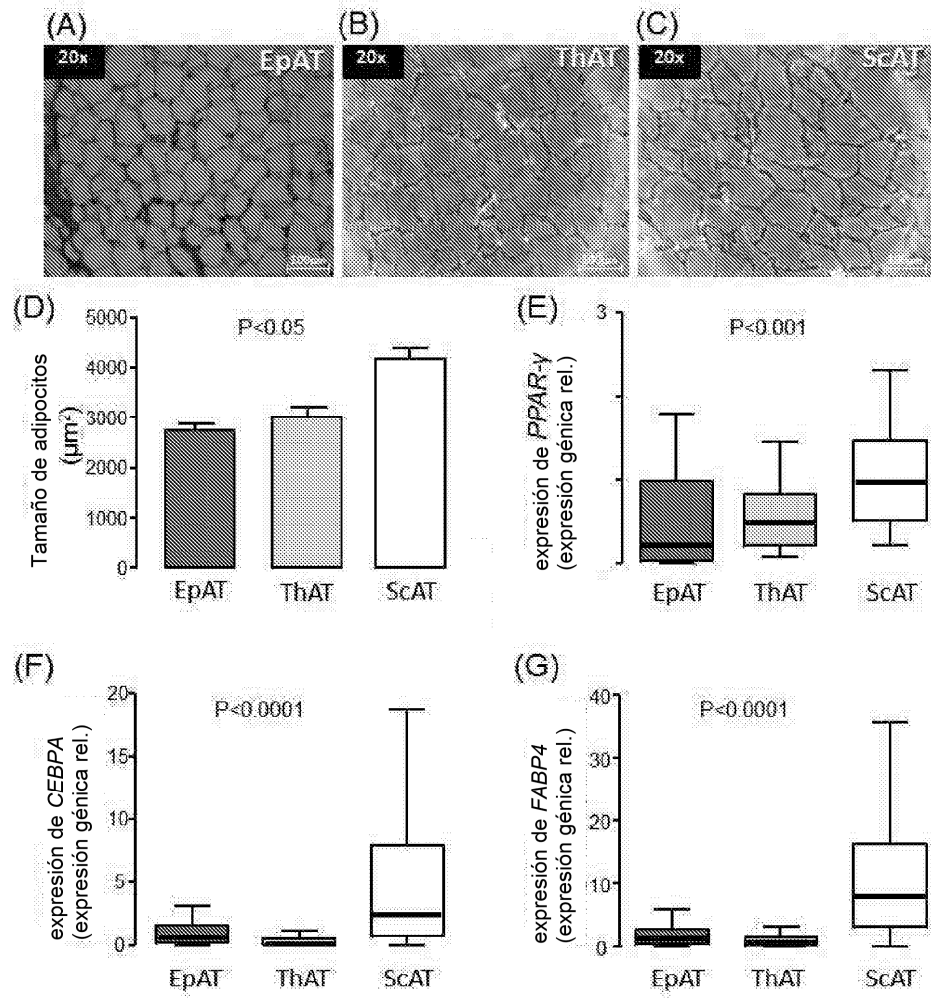


Figura 13



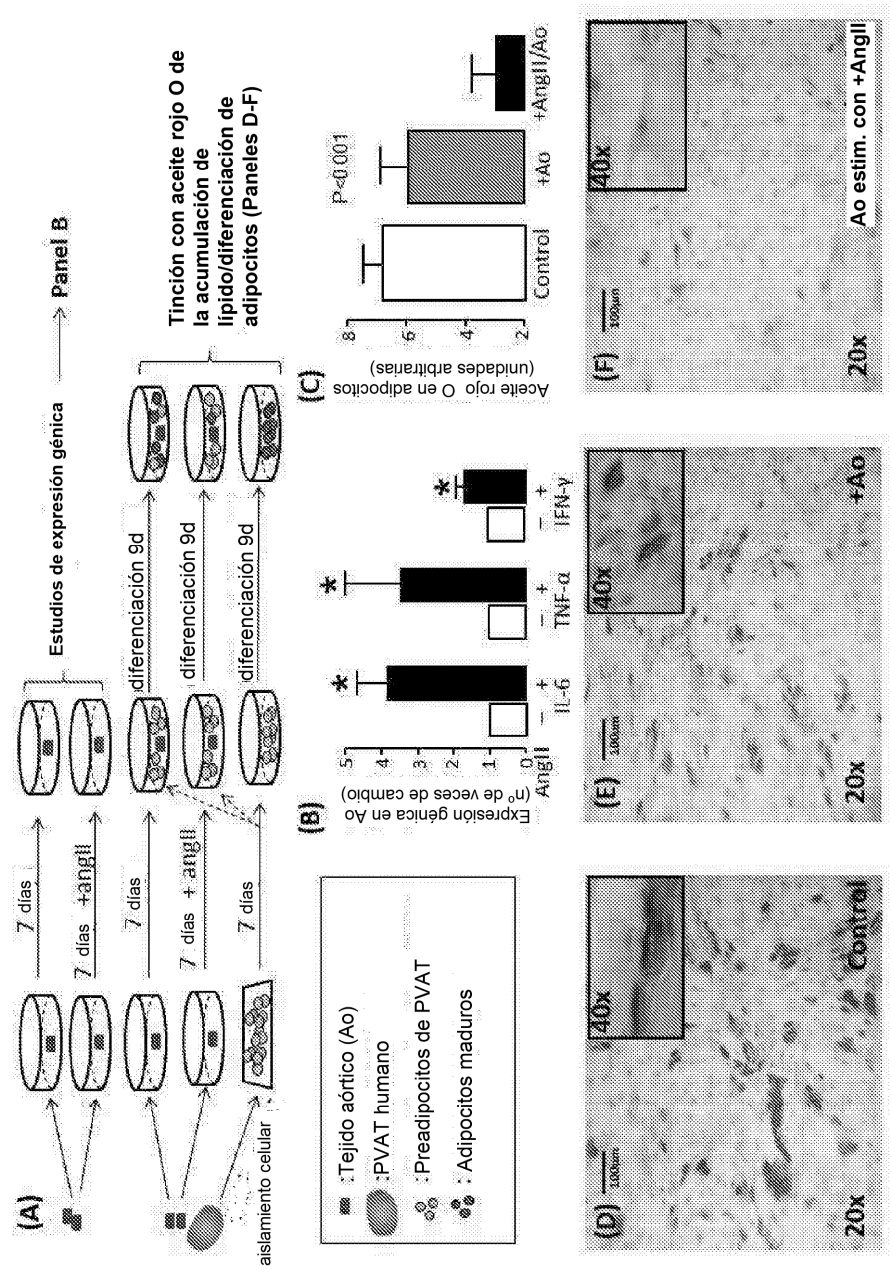


Figura 14

Figura 15

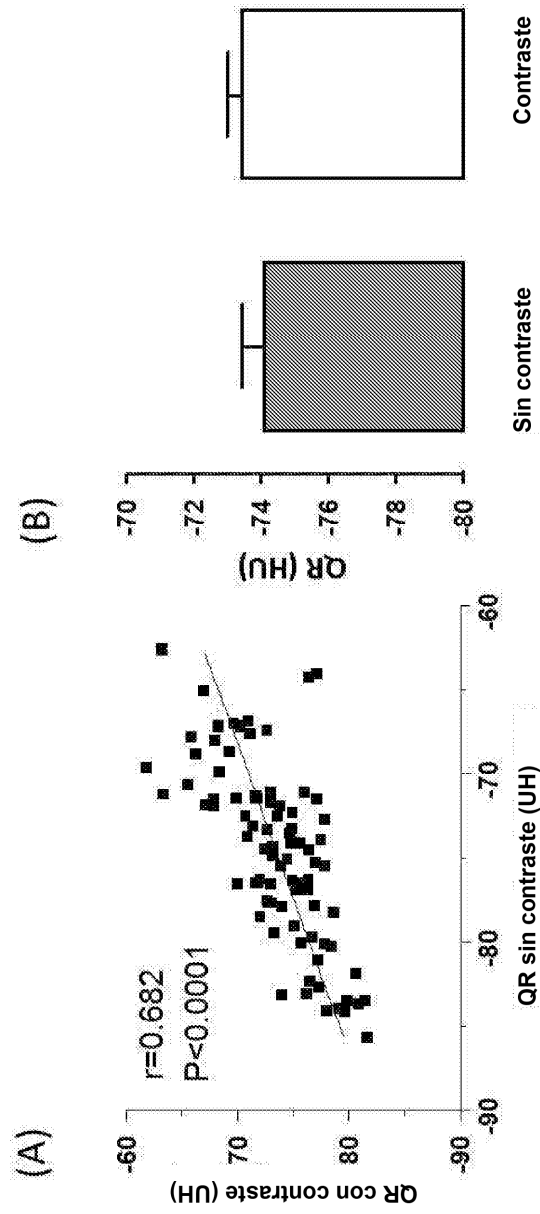


Figura 16

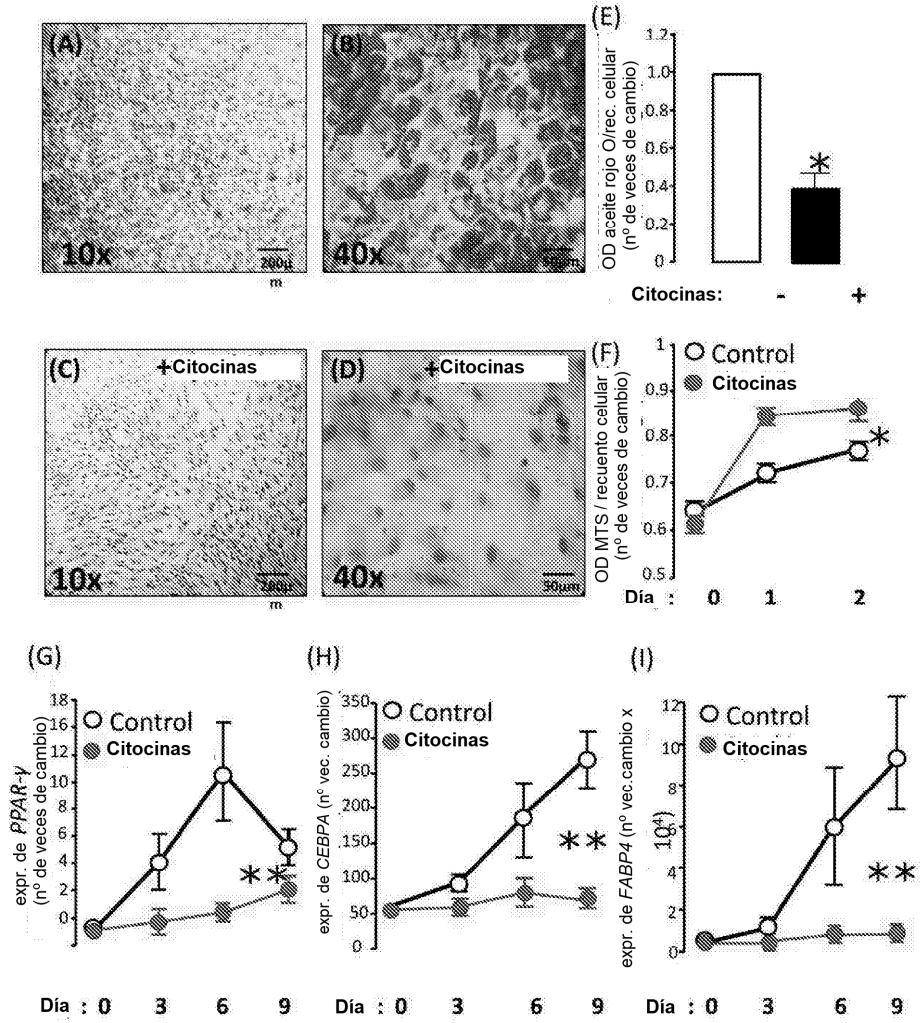


Figura 17

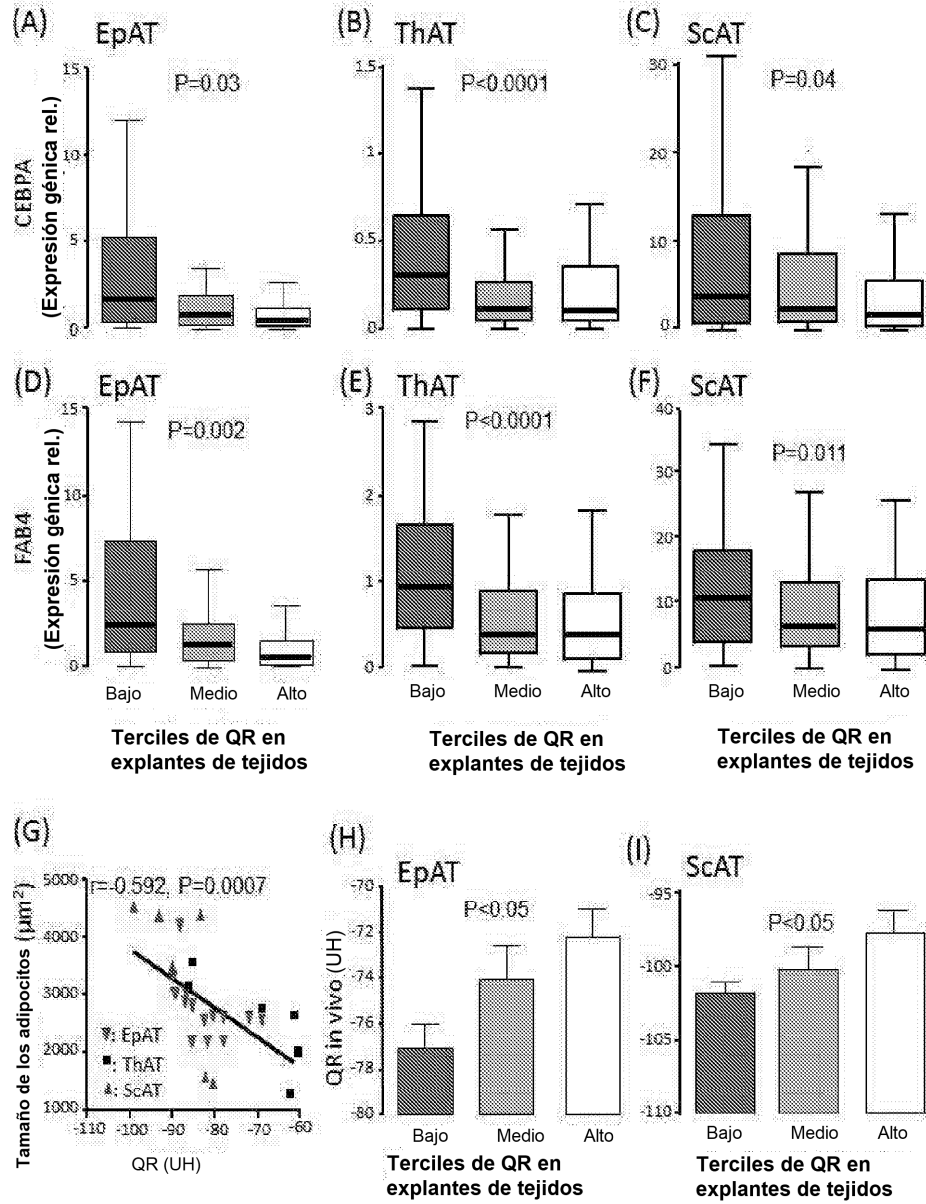


Figura 18

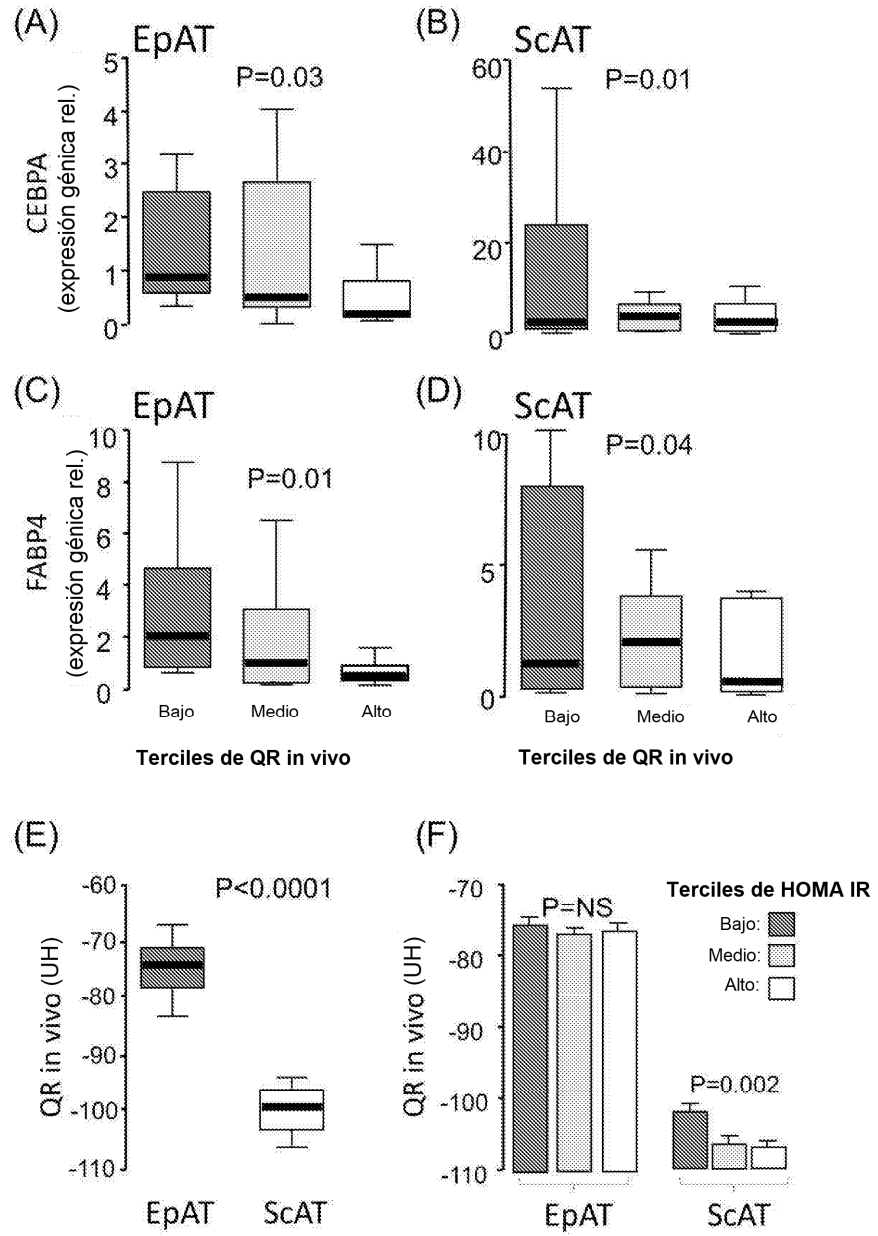


Figura 19

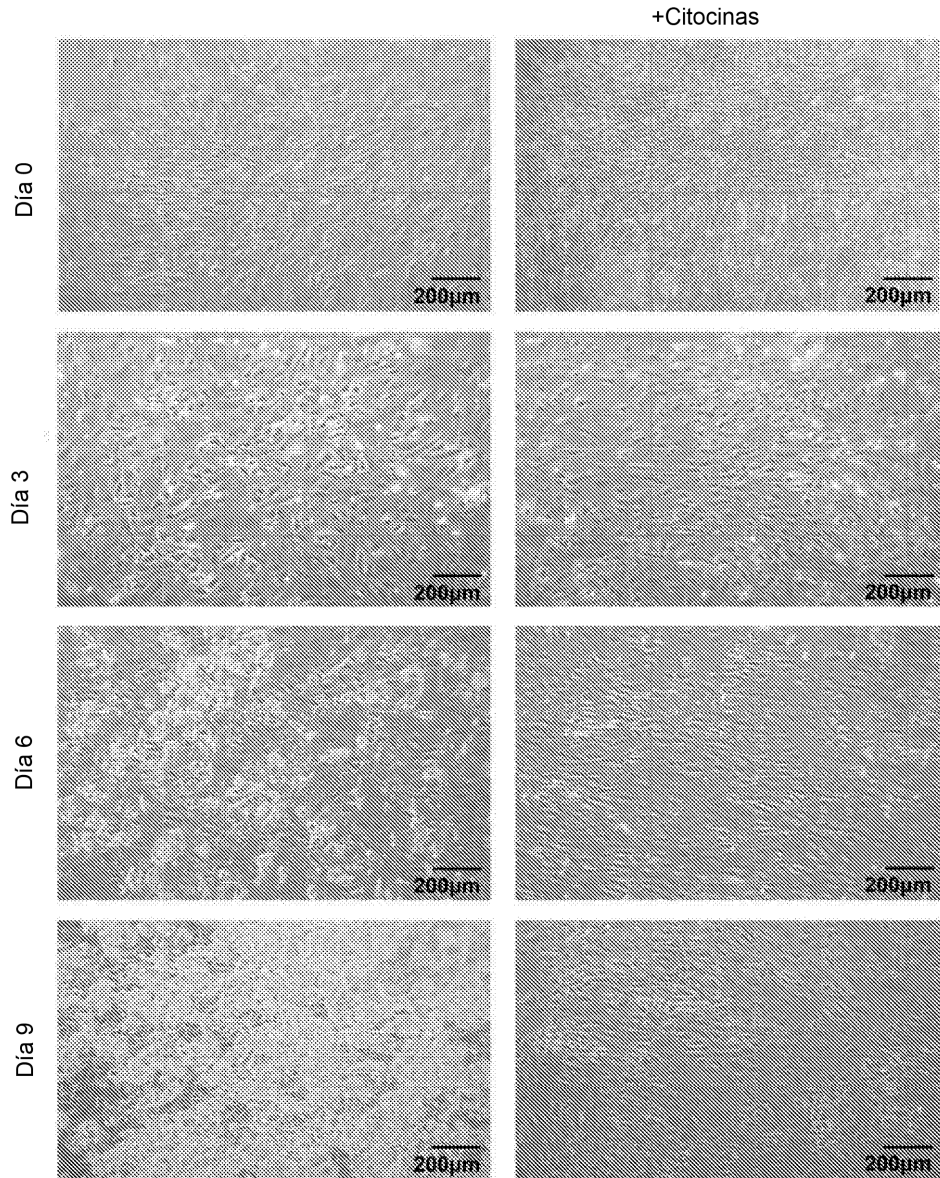


Figura 20

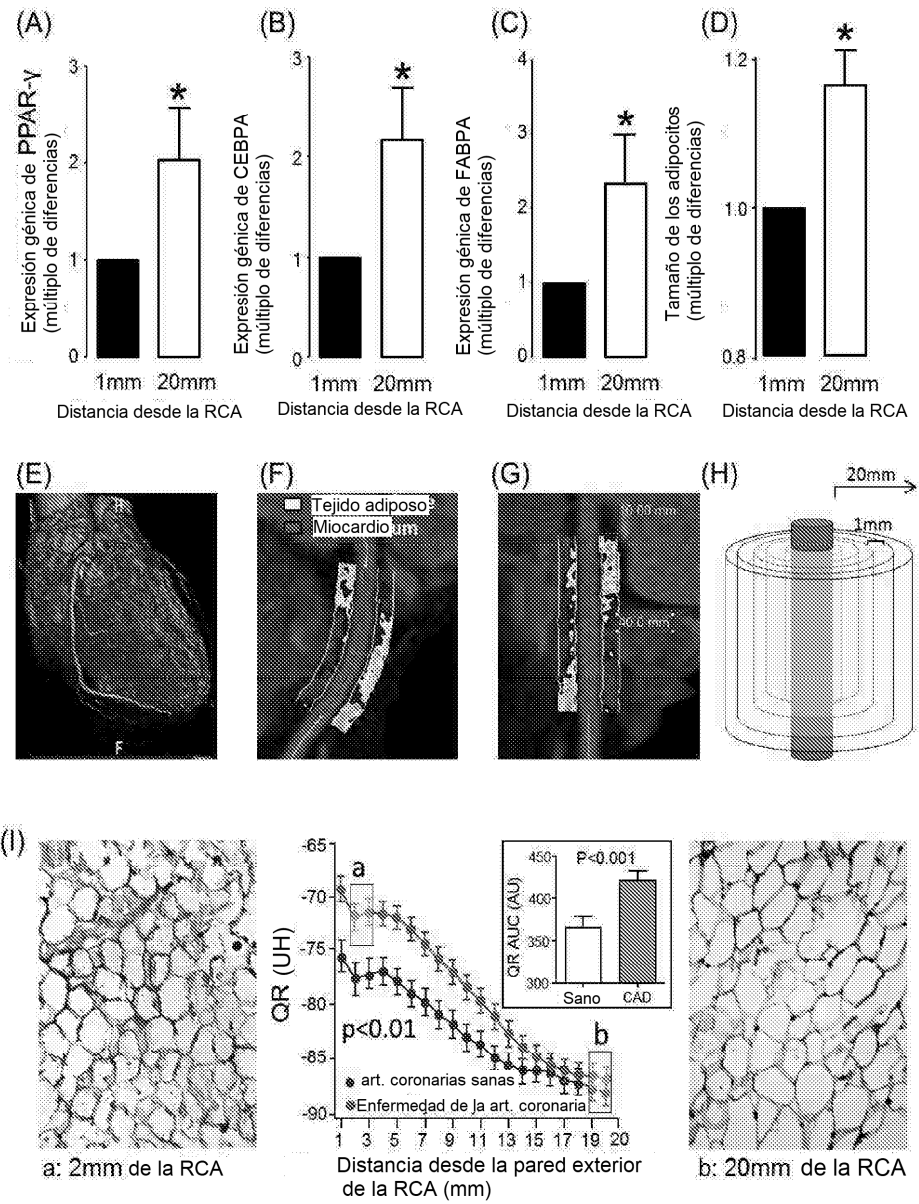


Figura 21

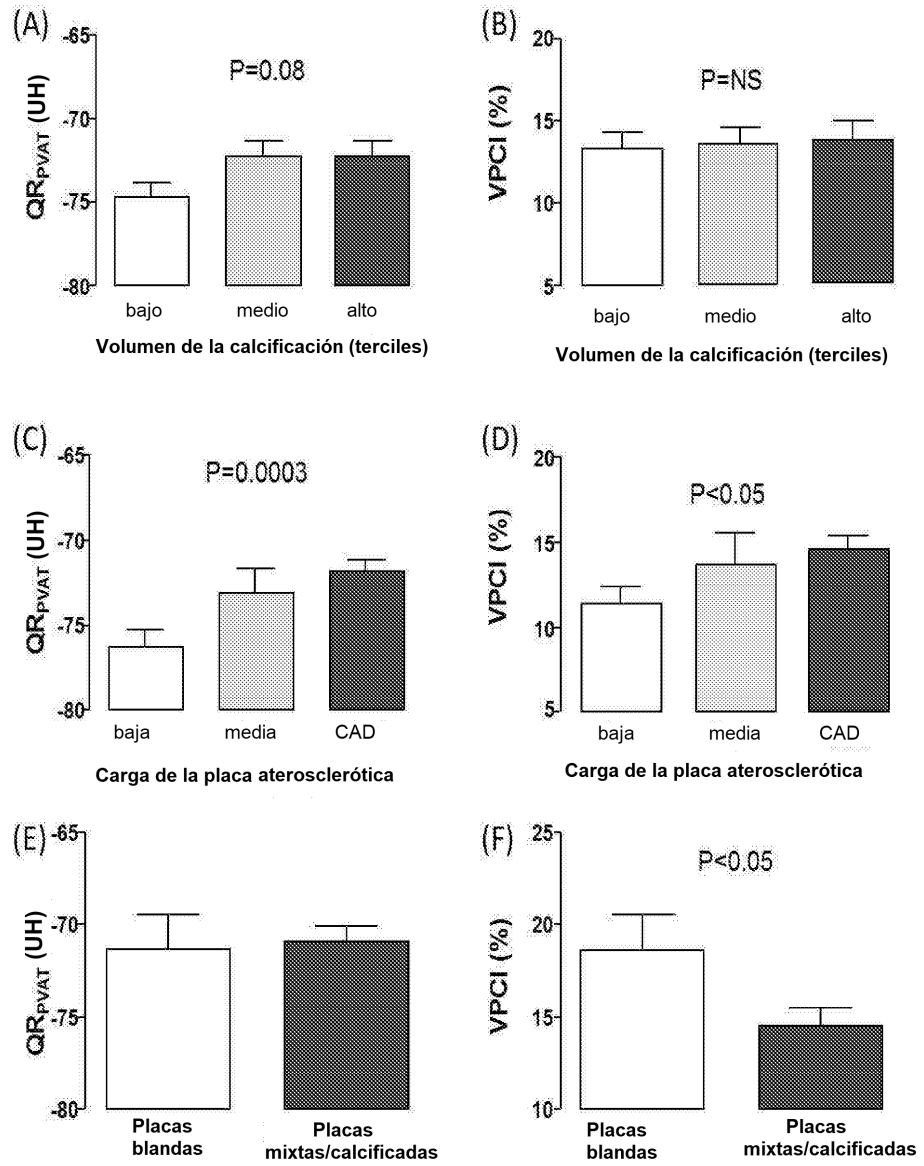


Figura 22

