



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR SILENTE

ANDREA VILAR BERGUA

Director:

Dra. PILAR DELGADO MARTÍNEZ

Tutor:

Dr. VICENT FONOLLOSA PLA

DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Barcelona, 2015

Esta tesis se ha realizado en el Laboratorio de Investigación Neurovascular del Institut de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron, gracias a la ayuda Predoctoral Fundació Josep Palau i Francàs.

El estudio ISSYS se ha financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI10/0705), FEDER y el Instituto de Salud Carlos III ((PI10/0705, PI14/1535, CM10/00063, and CP09/136),), Societat Catalana d'Hipertensió (6^a beca en recerca d'hipertensió), la Càtedra UAB Novartis Medicina de Família y el IDIAP Jordi Gol. El Laboratorio de Investigación Neurovascular recibe soporte de URIACH, S.A. y de la red de investigación cooperativa de enfermedades vasculares cerebrales (INVICTUS, RD12/0014/0005).

A mis padres y hermanas

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres primero, porque me han patrocinado y ayudado en estos 28 años. Gracias por preguntarme la lección, por entender que tengo la cabeza muy dura y necesitaba estudiar mucho, por las clases de música, de patinaje, de repaso, y por los “puedes hacer todo lo que te propongas”. A mis hermanas por apoyarme también, patrocinarme a veces y sobre todo, escucharme y ayudarme a reír aun en los ratos malos. Gracias Ana por enseñarme Londres, gracias Tati por darme sobrinos con los que jugar. A mis abus, por todos los veranos en Rasal, las meriendas, la bici y todos los momentos. Ellos siempre han creído en mí, y han estado orgullosos de mis logros. A mi abuelito Antonio, que me llevaba al cole cada día, y después, cuando empecé la carrera, y ya me preguntaba por el Nobel, todavía no abuelito, pero hoy quiero compartir esta tesis contigo.

A toda mi familia le agradezco todo su apoyo incondicional desde siempre, para decidir cada día, y llegar hasta aquí. También a los amigos que han ido llegando a lo largo de estos años, aunque hayamos tomado caminos diferentes, todos han dejado una huella importante.

Gracias a Carme, Ester y Félix, del laboratorio de Biología Celular de la UB, que me ayudaron con mis primeros pinitos en un laboratorio y con el Máster, tuvieron mucha mucha paciencia, me trataron con mucho cariño y pusieron a mi cargo una colonia de ratones C57BL/6 que me hicieron sentirme madre y verdugo a la vez, así como médico cirujano. Gracias a los compis de Bio: Miquel, Virginia, Jordi, Laura, y los demás. Y a los de Farmacia, por ayudarme y dejarme un trocito de poyata siempre que necesitara: Toni, Aurelio, Luisa, Sonia, Sergi, y los demás. Muchas gracias a todos por los western-blot, cultivos, inmunos, PCR, y esa primera aparición en Pubmed.

Gracias a Pepe y Cristina por mi breve estancia en el ICC-CESIC, los compis Silvia, Mar, Ricardo, Anna, Beatriz, Judit, Javier y los demás. Gracias por enseñarme tanto en tan poco tiempo, gracias por esa sala de cultivos tan guay y las batas verdes, por las PCR y el nitrógeno líquido. Nunca pensé que trabajaría en un enclave gaudiano tan bonito como el Hospital de Sant Pau.

Gracias a Joan y Pilar por acogerme y darme la oportunidad de trabajar en un grupo tan “pro”, tan grande y multidisciplinar. Gracias por enseñarme la parte aplicada de la investigación. Gracias por confiar en mí sin conocerme, y por la infinita paciencia. Gracias a todo el grupo de Neurovascular, por ayudarme cada día y enseñarme tantas cosas nuevas. Gracias Anita y Cris.B por enseñarme ELISAS, clot, a llevar la seroteca, y por llevarme a bioquímica. Gracias a Pilar, Iolanda y Cris.N por enseñarme el ISSYS, y compartir conmigo tanto conocimiento, las bases de datos, las resos, las muestras, para poder hacer biomarcadores. Gracias a Dolors, Alejandro y Caty, por adoptarme en el despacho y aguantarme cada día, por compartir risas tontas, estadística, medicina, recetas, y mil tonterías que hacen que los días pasen rápido, tan rápido que ya estamos aquí. Ya queda menos para montar nuestro propio grupo y Journal, con casinos... y más cosas. A los más novatos, a los veteranos y a los “mayores”, a todos muchas gracias.

Gracias Néstor, por estar cada día e intentar comprenderme.

GLOSARIO	I
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	IV
INTRODUCCIÓN 1	1
1.1 EL ICTUS:.....	2
1.1.1 <i>Definición y epidemiología:</i>	2
1.1.2 <i>Factores de riesgo:</i>	3
1.1.3 <i>Tipos de ictus:</i>	6
1.1.4 <i>Manifestaciones clínicas:</i>	6
1.1.5 <i>Manifestaciones radiológicas:</i>	7
1.2. LA ENFERMEDAD DE PEQUEÑO VASO CEREBRAL:	8
1.2.1 <i>Definición y epidemiología:</i>	8
1.2.2 <i>Etiología:</i>	9
1.2.3 <i>Diagnóstico por imagen:</i>	10
1.3 BIOMARCADORES:	15
1.3.1 <i>Definición y aplicaciones:</i>	15
1.3.2 <i>Biomarcadores en el ictus:</i>	16
1.3.3 <i>Uso de biomarcadores en la enfermedad de pequeño vaso silente:</i>	16
1.3.3.1 <i>Mecanismos relacionados con la fisiopatología de la EPVC:</i>	18
HIPÓTESIS 2.....	24
OBJETIVOS 3	26
METODOLOGÍA 4.....	28
4.1 ESTUDIO ISSYS.....	29
4.1.1 <i>Objetivos del estudio:</i>	29
4.1.2 <i>Visita basal:</i>	30
4.1.2.1 <i>Resonancia magnética:</i>	30
4.1.2.2 <i>Recogida y procesamiento de muestras biológicas:</i>	37

4.2 ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN EL ISSYS:	37
4.2.1 <i>Técnicas de laboratorio utilizadas en esta tesis:</i>	39
4.2.1.1 ELISA	39
4.2.1.2 Ensayo enzimático de actividad:.....	40
4.2.1.3 DSA-FACE (del inglés DNA Sequencer Adapted-Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis):.....	41
4.2.1.4 Inmunoturbidimetría:.....	42
4.3. HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS.	43
4.3.1 <i>Comparaciones múltiples:</i>	43
4.3.2 <i>Regresión logística:</i>	43
4.3.3 <i>Áreas bajo la curva característica operativa del receptor (AUC-ROC)</i>	44
4.3.4 <i>Índice de mejoría de la discriminación (IDI):</i>	45
4.3.5 <i>Test de la razón de verosimilitud (Likelihood ratio test)</i>	46
5.1 REVISIÓN DE LA LITERATURA ACERCA DEL PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR SILENTE:	48
5.2. ESTUDIO DE LOS BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE INFARTOS CEREBRALES SILENTES.....	53
5.2.1 <i>Actividad Lp-PLA2:</i>	54
5.2.2 <i>Patrones de N-glicosilación sérica:</i>	58
5.2.3 <i>NT-proBNP:</i>	63
5.2.4 <i>Valor añadido de los biomarcadores en el diagnóstico de los ICS</i>	65
5.2.4.1 <i>Actividad de Lp-PLA2:</i>	65
5.2.4.2 <i>Patrones de N-glicosilación sérica:</i>	66
5.2.4.3 <i>NT-proBNP</i>	67
5.2.5 <i>Resumen de los hallazgos principales, y combinación de los biomarcadores.</i>	68
5.3 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LAS LSB EN EL ESTUDIO ISSYS:	70
5.3.1 <i>Relación de los biomarcadores analizados con la presencia de LSB:</i>	71

5.3.1.1 Actividad de Lp-PLA2	71
5.3.1.2 Patrones de N-glicosilación sérica:	73
5.3.1.3 NT-proBNP:	73
5.3.1.4 Microalbuminuria:	75
5.3.5 <i>Resumen de los hallazgos:</i>	75
5.4 CÁLCULO DE UNA ESCALA DE PEQUEÑO VASO CEREBRAL Y FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS	76
5.4.1 <i>Biomarcadores asociados con el grado de EPVC.</i>	78
5.4.2 <i>Análisis multivariante y resumen de los hallazgos:</i>	78
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS 6	80
6.1 ENFERMEDAD DE PEQUEÑO VASO CEREBRAL Y BIOMARCADORES:	81
6.2 FOSFOLIPASA A2 ASOCIADA A LIPOPROTEÍNAS Y EPVC	83
6.3. PERFIL DE N-GLICOSILACIÓN EN SUERO Y EPVC:	86
6.4. NT-PROBNP Y EPVC	89
6.6 UTILIDAD DE UNA ESCALA DE EPVC Y ASOCIACIÓN CON BIOMARCADORES:	91
6.7 FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO DE BIOMARCADORES DEL ISSYS:	94
6.8 PERSPECTIVAS:	95
CONCLUSIONES 7	96
BIBLIOGRAFÍA 8	98
ANEXOS 9	109
Anexo I	110
Anexo II	111
Anexo III	112

Glosario

ADMA: dimetilarginina asimétrica.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

APTS: ácido 8-amino-1,3,6- pirenotrisulfónico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARWMC : cambios de la sustancia blanca asociados a la edad.

Asn: aspartato.

AUC-ROC: área bajo la curva de característica operativa del receptor.

CADASIL: arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía.

CARASIL: arteriopatía cerebral autosómica recesiva con infartos subcorticales y leucoencefalopatía.

CRP: proteína reactiva C, *C-reactive protein*.

CV: coeficiente de variación.

DM: diabetes mellitus.

DSA-FACE: *DNA sequencer adapted-fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis*.

DTi: *difussor tensor image* o imagen con tensor de difusión.

DWI: imagen de difusión ponderada o *Difussion Weighted imaging*.

EA: enfermedad de Alzheimer.

ECLIA: *ensayo por inmunoabsorción y electroquimioluminiscencia*.

EDTA: ácido etilendiamintetracético.

e FGR: filtrado glomerular estimado.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EPVC: enfermedad de pequeño vaso cerebral

EPVD: espacios perivasculares dilatados.

E-selectin: selectina e.

FDR: *false discovery rate*

FLAIR: Recuperación de la inversión atenuada en líquido o *fluid attenuated inversion recovery*.

Glc: glucosa.

GRE: *T2 gradient recalled echo*.

GWAS: *estudios de genoma de asociación del genoma completo*.

HCY: *homocisteína*.

HTA: hipertensión arterial.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1.

ICS: infarto cerebral silencioso.

IDI: índice de mejoría de la discriminación.

IMC: índice de masa corporal.

IL-6: interleucina 6.

ISSYS: *Investigating Silent Strokes in hYpertensives, a magnetic resonance imaging Study*.

LCR: líquido cefalorraquídeo.

LDL: lipoproteínas de baja densidad.

Lp-PLA2: fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas.

LR test: test del ratio de verosimilitud o *likelihood ratio test*.

LSB: lesiones de la sustancia blanca.

Man: manosa.

MCP-1/CCL2: proteína de atracción de monocitos/ligando 2 de la quimiocina de motivo c-c.

MTR: *magnetic transfer ratio*, imagen de ratio de transferencia de magnetización.

NAc: N-acetil glucosamina.

NT-proBNP: fragmento N-terminal del péptido natriurético cerebral.

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: *odds ratio*.

OxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.

P-selectin: selectina p.

PAD: presión arterial diastólica.

PAS: presión arterial sistólica.

PNGase: n-glicosidasa del péptido F.

Pro: prolina.

REGICOR: *Registre Gironí del Cor*

RBP4: Proteína 4 de unión a retinol.

RM: resonancia magnética

ROI: *region of interest*).

Ser: serina.

STRIVE: *standards for reporting vascular changes on neuroimaging*.

T: tesla.

t-PA: activador tisular del plasminógeno.

TC: tomografía computerizada.

Thr: treonina.

TNF α : factor de necrosis tumoral alpha.

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1.

Listado de tablas y figuras

- Tabla 1..** Resumen de los biomarcadores más estudiados en el contexto de enfermedad cerebrovascular silente (página 50)
- Tabla 2.** Características basales de la muestra completa y análisis univariante de los ICS. (página 53)
- Tabla 3.** Variables asociadas con la actividad de Lp-PLA2. (página 55)
- Tabla 4.** Análisis multivariante para la asociación de la actividad Lp-PLA2 con la presencia de IS (página 58)
- Tabla 5.** Relaciones entre los factores de riesgo vascular y las concentraciones relativas de los N-glicanos detectados en suero. (página 60)
- Tabla 6.** Análisis multivariante para la asociación de los picos de glicosilación con la presencia de IS. (página 62)
- Tabla 7.** Descripción de las características de la muestra y análisis univariante del NT-proBNP. (página 64)
- Tabla 8** Análisis univariante para el volumen de LSB y para la presencia de LSB extensas en localización periventricular o profunda. (página 72)
- Tabla 9.** Análisis multivariante de la relación entre NT-proBNP y LSB. (página 74)
- Tabla 10.** Tabla de contingencia de la asociación de la microalbuminuria con las LSB extensas en localización periventricular y profunda (página 75)
- Tabla 11.** Análisis univariante de los grados de EPVC (página 77)
- Tabla 12.** Biomarcadores asociados al grado de EPVC. (página 78)
- Tabla 13.** Análisis multivariante para el grado de EPVC. (página 79)
- Figura 1.** Ejemplo representativo de un infarto subcortical silente. (página 7)
- Figura 2.** Espacios perivasculares: localización y estructura. (página 13)

Figura 3. Ejemplos representativos de las lesiones examinadas en el estudio ISSYS.
(página 21)

Figura 4. Representación de la obtención de los valores estandarizados de volumen de LSB. (página 23)

Figura 5. Grados de la escala Fazekas en localización periventricular y profunda.
(página 24)

Figura 6. Lesiones representativas de los componentes de la escala de carga de EPVC. (página 26)

Figura 7. Representación gráfica del estadístico comparativo del índice de mejoría de la discriminación. (página 46)

Figura 8. Relaciones funcionales de los biomarcadores más estudiados en relación a enfermedad cerebrovascular silente y los biomarcadores predichos más probablemente asociados a éstos. (página 52)

Figura 9. Representación gráfica de los niveles de actividad de Lp-PLA2 en los grupos de pacientes analizados. (página 54)

Figura 10. Representación gráfica de la relación de la actividad de Lp-PLA2 con los ICS y con el sexo. (página 56)

Figura 11. Representación gráfica de las diferencias entre sexos en la relación de la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS. (página 58)

Figura 12. Representación gráfica del perfil sérico de los N-glicanos. (página 59)

Figura 13. Representación gráfica de la relación entre NA2F y NA3Fb y la presencia (Paneles A y B) y número (Paneles C y D) de ICS. (página 61)

Figura 14. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de la actividad de Lp-PLA2 con la presencia de ICS. (página 65)

Figura 15. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de NA2F con la presencia de ICS (página 66)

Figura 16. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de NT-proBNP con la presencia de ICS. (página 67)

Figura 17. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de los niveles de NA2F, la concentración de NT-proBNP y la presencia de microalbuminuria, con la presencia de ICS. (página 69)

Figura 18. Concordancia de las medidas de LSB. (página 70)

Figura 19. Representación gráfica de la relación entre NA2F y LSB extensas (página 73)

Introducción 1

1.1 El ictus:

1.1.1 Definición y epidemiología:

Un ictus se produce por un cambio repentino del flujo sanguíneo en el cerebro, que altera la función de una o varias regiones determinadas del mismo. La Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO) define el ictus como un desarrollo rápido de signos focales de alteración de la función cerebral con un origen vascular claro (1988).

El ictus puede deberse, tanto a una disminución importante de la llegada de sangre al cerebro (fruto de una oclusión arterial), como a la extravasación de sangre en el parénquima cerebral debida a la ruptura de uno o más vasos cerebrales de mayor o menor calibre. En el primer caso, hablamos de ictus isquémico, que representa un 85% de los casos, y cuya consecuencia final es el infarto cerebral (conjunto de procesos fisiopatológicos irreversibles que conducen a la muerte de las células cerebrales por falta del suministro de oxígeno y nutrientes). En el segundo lugar, hablamos de ictus hemorrágico, que, aunque es mucho menos frecuente, conlleva una elevada morbilidad y mortalidad. El impacto del ictus o enfermedades cerebrovasculares es muy importante, en España son una causa muy frecuente de hospitalización, muerte y discapacidad; de hecho se trata de la segunda causa de mortalidad en la población general (la primera en mujeres, y la segunda en hombres detrás del cáncer). El gasto sanitario que supone el ictus para el Sistema Nacional de Salud se estimó en 2010 en 13.329 euros por paciente y año, esto es, unos 8.584 millones de euros.

Este impacto económico, junto con la elevada incidencia y el mal pronóstico del ictus, hacen necesario el esfuerzo en el desarrollo de planes de prevención (Diaz-Guzman, Bermejo-Pareja et al. 2008), (Diaz-Guzman, Egido et al. 2012), (Pares-Badell, Barbaglia et al. 2014).

1.1.2 Factores de riesgo:

En la mayoría de casos, el ictus se manifiesta como el resultado final del acúmulo de una serie de factores de riesgo, entre los que se encuentran los hábitos alimenticios o de estilo de vida en general. El sistema circulatorio es el órgano diana en el que repercuten todos estos factores al cabo de los años. Actualmente se han definido e identificado los factores de riesgo más importantes (Meschia, Bushnell et al. 2014), entre los que existen factores no modificables y modificables.

Los factores de riesgo no modificables son:

- Edad: a partir de los 60 años el riesgo de ictus aumenta de forma significativa, de forma independiente a otros factores de riesgo (Fanning, Wong et al. 2014).
- Sexo: la incidencia del ictus es mayor en los hombres hasta la vejez, no obstante, la mortalidad es mayor en las mujeres (Fanning, Wong et al. 2014).
- Tener historia familiar de ictus o haber tenido un episodio de ictus previo, también aumenta de forma significativa el riesgo de padecer un ictus (Meschia, Bushnell et al. 2014).
- Diversos estudios comparativos entre razas o etnias, han mostrado tasas más elevadas de incidencia de ictus en afroamericanos, chinos y japoneses (Meschia, Bushnell et al. 2014).

La prevención en este contexto, ha adquirido mucha importancia en los últimos años, se trata del manejo y control de los factores modificables para reducir la incidencia de las enfermedades cerebrovasculares. De éste modo, se ha reducido de forma significativa la incidencia y la mortalidad del ictus en los últimos 25 años.

Factores modificables:

La hipertensión arterial (HTA) es el factor de riesgo modificable más importante para el ictus, tanto isquémico como hemorrágico, y para otras afecciones vasculares, como el infarto lacunar, las lesiones de la sustancia blanca, los microsangrados, deterioro cognitivo y demencia vascular. A partir de los 50 años se recomienda el control anual de la presión arterial; si las cifras superan 140/90 el control médico debe aumentar (Pistoia, Sacco et al. 2015).

Las enfermedades cardíacas de tipo isquémico, con origen en la arterioesclerosis de las arterias coronarias, aumentan significativamente el riesgo de padecer un ictus, ya que la mayoría de ictus isquémicos son el resultado de procesos de arterioesclerosis. El hecho de padecer una arritmia, como la fibrilación auricular, incrementa todavía más el riesgo.

El tabaquismo se ha asociado de forma consistente con la arterioesclerosis, enfermedades cardíacas e ictus (Albertsen, Overvad et al. 2015).

Los niveles alterados de colesterol y triglicéridos, no se han asociado de forma directa con el riesgo de ictus, pero sí se conoce su estrecha relación como factor de riesgo para arterioesclerosis y enfermedades cardíacas.

La diabetes mellitus (DM) es un factor de riesgo para muchas enfermedades del sistema circulatorio. No obstante, los pacientes diabéticos pueden llevar un buen control de su enfermedad y así reducir significativamente las probabilidades de ictus (Meschia, Bushnell et al. 2014).

El consumo excesivo de alcohol puede conducir a múltiples complicaciones médicas, entre las cuales está el ictus. La gran mayoría de estudios sugieren que el consumo leve o moderado, se asocia con una disminución del riesgo de ictus, mientras que el consumo excesivo se asocia con un incremento en el riesgo de padecer un ictus.

El índice de masa corporal ($IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m)}^2$), por encima de 25 kg/m^2 , y la obesidad abdominal son ambos predictores independientes del ictus (Suk, Sacco et al. 2003).

La falta de actividad física o sedentarismo, se asocia con mortalidad general, con morbilidad y mortalidad cardiovascular y con el ictus. Pero la asociación entre la cantidad e intensidad de actividad física y el ictus, continúa sin determinarse, aunque se sospecha que los efectos beneficiosos de la práctica de ejercicio físico, sean diferentes en hombres y en mujeres.

El síndrome metabólico, que se define como una amalgama de factores de riesgo vascular y defectos metabólicos que incluyen, al menos tres de los factores de riesgo mencionados anteriormente (hipertensión, glucemia alterada en ayunas, hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo y / o obesidad abdominal), se asocia también con el incremento del riesgo de padecer un ictus (Meschia, Bushnell et al. 2014).

Por último, la resistencia a la insulina se ha propuesto como el factor central para el desarrollo de factores de riesgo vascular. La disminución de la sensibilidad de los tejidos a la insulina, en individuos con predisposición genética como consecuencia del sedentarismo y obesidad abdominal entre otros. Esto puede conducir a un metabolismo de glucosa y de lípidos anormales, aumento de la presión arterial, cambios de la reactividad vascular y disfunción endotelial, inflamación crónica de bajo grado o subclínica, y a un fenotipo protrombótico (Arenillas, Moro et al. 2007).

1.1.3 Tipos de ictus:

Los ictus isquémico y hemorrágico pueden clasificarse a su vez, en función del territorio cerebral afectado, la extensión, la duración, o la etiología subyacente.

Según el vaso afectado, se clasifican en enfermedad de gran vaso (arterias carótidas, vertebro-basilares y sus principales ramas) y de pequeño vaso (arterias, arteriolas de pequeño diámetro, capilares y vénulas) (Pistoia, Sacco et al. 2015), (Martí-Vilalta 2004).

1.1.4 Manifestaciones clínicas:

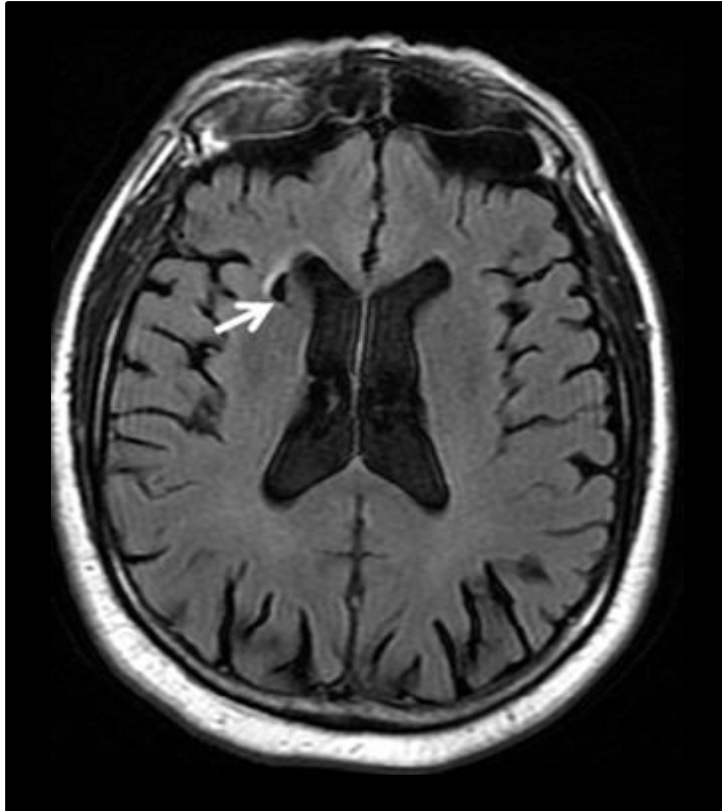
Las manifestaciones clínicas de los infartos cerebrales difieren en función del territorio y vaso afectados. En las regiones corticales, los infartos producen déficits neurológicos de las funciones superiores, esto es, trastornos del habla o lenguaje (afasias), déficits motores o sensitivos de extremidades y/o de la cara, negligencia, déficit visual de tipo hemianopsia, discalculia, agrafia y alteraciones visuoespaciales, entre otras.

Por otro lado, los infartos lacunares, de pequeño tamaño (<20 mm) y localizados en la sustancia blanca subcortical o gris profunda, se asocian con los denominados síndromes lacunares clásicos (hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo-motor, disartria-mano torpe y hemiparesia atáxica) (Fisher 1965).

Ambos tipos de infartos cerebrales pueden presentarse también sin **manifestaciones clínicas evidentes y en ese caso se dice que son asintomáticos, o silentes**. En la **figura 1**, se muestra una imagen representativa de un infarto cerebral silente (ICS) localizado en la cabeza del núcleo caudado izquierdo.

Habitualmente se trata de infartos que, por tener un tamaño pequeño o por su topografía, no han dado síntomas compatibles con un ictus, o éstos han pasado desapercibidos por el propio paciente, familiares e incluso personal sanitario.

Figura 1. Ejemplo representativo de un infarto subcortical silente



De hecho, la mayoría de infartos silentes son de tipo lacunar y se asocian además a cambios de la sustancia blanca cerebral (las denominadas hiperintensidades de la sustancia blanca), e incluso microhemorragias. Todos estos hallazgos silentes se detectan frecuentemente en la enfermedad de pequeño vaso cerebral (EPVC), y serán el objeto de esta tesis (Wardlaw, Smith et al. 2013), (Delgado 2012), (Arboix 2012).

1.1.5 Manifestaciones radiológicas:

El ictus se diagnostica mediante criterios clínicos, y se confirma con pruebas de imagen cerebral (Tomografía computerizada (TC) o Resonancia Magnética (RM) Cerebral). Mediante éstas pruebas se diferencian las etiologías isquémica y hemorrágica, y se puede hacer diagnóstico diferencial con otras lesiones cerebrales que muestran una sintomatología similar.

Los infartos cerebrales silentes (ICS) se describieron inicialmente en estudios postmortem y en la actualidad se visualizan mediante las mismas técnicas de imagen que el ictus.

No obstante, la mayoría de estudios poblacionales que se han realizado para conocer la prevalencia de los ICS han utilizado la RM como prueba de imagen, al ser esta técnica más sensible para su detección que la TC cerebral. En la población general se estima una prevalencia de los ICS de entre el 8 y el 28% para el rango de edad 50-94 años (Vermeer, Longstreth et al. 2007).

Los criterios utilizados para el diagnóstico por resonancia magnética cerebral de los infartos cerebrales se discutirán más adelante.

1.2. La enfermedad de pequeño vaso cerebral:

1.2.1 Definición y epidemiología:

Las enfermedades de pequeño vaso se definen como enfermedades sistémicas, que pueden afectar a varios órganos (cerebro, retina, riñón) al mismo tiempo, o sucesivamente, aunque, en algunos casos sólo hay un órgano diana.

En la EPVC, los vasos cerebrales afectados son las arterias perforantes cerebrales, que irrigan el territorio que comprende la línea media de los hemisferios cerebrales y el tronco encefálico. Son vasos de pequeño diámetro, con origen en las arterias cerebrales principales, que no muestran anastomosis terminales, ni circulación colateral, y son más sensibles a la elevación y/o cambios de la presión arterial. También se ha descrito la afectación de capilares y vénulas.

La prevalencia de la EPVC, la sitúa entre las enfermedades neurológicas más frecuentes, y además tiene un papel muy importante en los procesos del envejecimiento, en el infarto cerebral y en la demencia (Pantoni 2010), (Windham, Deere et al. 2015).

1.2.2 Etiología:

Las causas que dan origen a la EPVC se pueden clasificar en seis apartados, siguiendo la propuesta de Pantoni y colaboradores: **Tipo I:** Arterioesclerosis (enfermedad de pequeño vaso asociada al envejecimiento y a factores de riesgo vascular); es la forma más prevalente, y la que nos atañe en esta tesis doctoral; **Tipo II:** angiopatía amiloide cerebral esporádica y hereditaria; **Tipo III:** enfermedad de pequeño vaso cerebral hereditaria: arteriopatías cerebrales con infartos subcorticales y leucoencefalopatía, de tipo autosómica dominante (CADASIL) o recesivo (CARASIL), enfermedad de Fabry; **Tipo IV:** enfermedad de pequeño vaso mediada por procesos inflamatorios y de respuesta inmunológica; **Tipo V:** colagenosis venosa; **Tipo VI:** otros tipos (Pantoni 2010).

La EPVC asociada al envejecimiento y a los factores de riesgo vascular se denomina arterioesclerosis, y conlleva una serie de cambios en los vasos, como son la pérdida de las células de músculo liso de la túnica media, la formación de depósitos de material fibroelástico, el estrechamiento del lumen y el adelgazamiento de la pared del vaso.

Esta forma de la enfermedad es muy común, y puede manifestarse de forma sistémica, afectando no sólo a los vasos pequeños cerebrales (EPVC), sino también a los vasos pequeños en el riñón y en la retina. Se ha asociado de forma muy consistente con el envejecimiento, la diabetes mellitus y la hipertensión (Furuta, Ishii et al. 1991).

1.2.3 Diagnóstico por imagen:

Hoy en día se han identificado y relacionado entre sí, las principales lesiones visibles en RM convencional que corresponden a EPVC (Wardlaw, Smith et al. 2013), entre las cuales se incluyen los infartos subcorticales o lacunares agudos (*o infartos subcorticales pequeños*), lagunas (*cavidades llenas de líquido que corresponderían a infartos antiguos y son principalmente silentes*) (Vermeer, Longstreth et al. 2007), lesiones de la sustancia blanca (LSB) (Rost, Rahman et al. 2010), espacios perivasculares dilatados (EPVD) (Doubal, MacLulich et al. 2010), microsangrados (Cordonnier, Potter et al. 2009), y atrofia cerebral (Aribisala, Wiseman et al. 2014).

Más allá de la RM convencional, técnicas avanzadas de RM como la imagen con tensor de difusión (siglas en inglés: DTi) o la imagen de ratio de transferencia de magnetización (siglas en inglés MTR), permiten detectar otras lesiones cerebrales relacionadas con la EPVC (no visibles con técnicas de resonancia convencional), como son las alteraciones de la integridad de la sustancia blanca de apariencia normal, conexiones axonales dañadas, incrementos en el contenido de agua del cerebro, alteraciones de la mielinización y adelgazamiento focal secundario de la sustancia gris cortical.

El curso de la EPVC no se ha determinado totalmente, se hipotetiza que comienza con una etapa inicial subclínica, que puede durar varios años, y en la cual aparecen las denominadas lesiones silentes (habitualmente si no se diagnostican) hasta que se dan síntomas neurológicos focales debidos a un ictus lacunar o deterioro cognitivo inicial.

La detección precoz de las lesiones silentes, contribuiría al diagnóstico de la EPVC antes de que se desarrolle una sintomatología más pronunciada y se incremente el riesgo de ictus y demencia. A pesar de que actualmente no existe un tratamiento para la EPVC, el manejo de los factores de riesgo descritos en el apartado anterior, facilitaría la prevención de la aparición de nuevas lesiones y síntomas.

Como veremos en el siguiente apartado, el uso de biomarcadores plasmáticos predictores de la presencia y progresión de las lesiones de EPVC, permitiría un diagnóstico rápido y de bajo coste. La combinación del control de factores de riesgo y los biomarcadores plasmáticos componen una herramienta muy útil a desarrollar, en la prevención del ictus y demencia asociados a la EPVC.

En la literatura se encuentra una gran abundancia de términos para las diferentes hallazgos radiológicos que caracterizan la EPVC, por ello se han intentado unificar las definiciones, de acuerdo a los estándares establecidos en la *Equator Network (Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research)*, en un consenso elaborado por el grupo de expertos STRIVE (siglas en inglés de *STandards for Reporting Vascular changes on nEuroimaging*) en el año 2013. De éste modo se espera homogeneizar la terminología y los métodos de análisis para los estudios futuros, facilitando la comparación de resultados y la traslación a la práctica clínica, así como la elaboración de estudios de meta-análisis (Wardlaw, Smith et al. 2013).

A continuación se describen con detalle, las definiciones establecidas por el grupo STRIVE:

Un infarto lacunar o **infarto subcortical reciente**, es una lesión de menos de 20mm en su máximo diámetro, localizada en el territorio de las arterias perforantes. Muestran sintomatología o evidencia de imagen consistente con la aparición de la lesión en semanas anteriores. Presentan intensidad de señal aumentada en imagen ponderada por difusión (siglas en inglés: DWI), en la secuencia de recuperación de la inversión atenuada de fluido (siglas en inglés: FLAIR), en la secuencia ponderada en T2; e intensidad de señal reducida en la secuencia ponderada en T1, en comparación a la sustancia blanca o gris normales.

Estas lesiones progresan con el tiempo: se convierten en lagunas cavitadas; otras no se cavitan y alcanzan el aspecto de LSB, y otras desaparecen (Conklin, Silver et al. 2014). Las lagunas o lagunas de supuesto origen vascular, son lesiones cavitadas, que contienen líquido cefalorraquídeo (LCR), con un diámetro máximo comprendido entre 3 y 15mm, se localizan en la sustancia blanca o gris profundas (subcorticales), y son consistentes con un infarto agudo pequeño previo o una hemorragia en el territorio de una de las arterias perforantes. En FLAIR muestran intensidad de señal similar al LCR, y un anillo de señal aumentada rodeando la lesión.

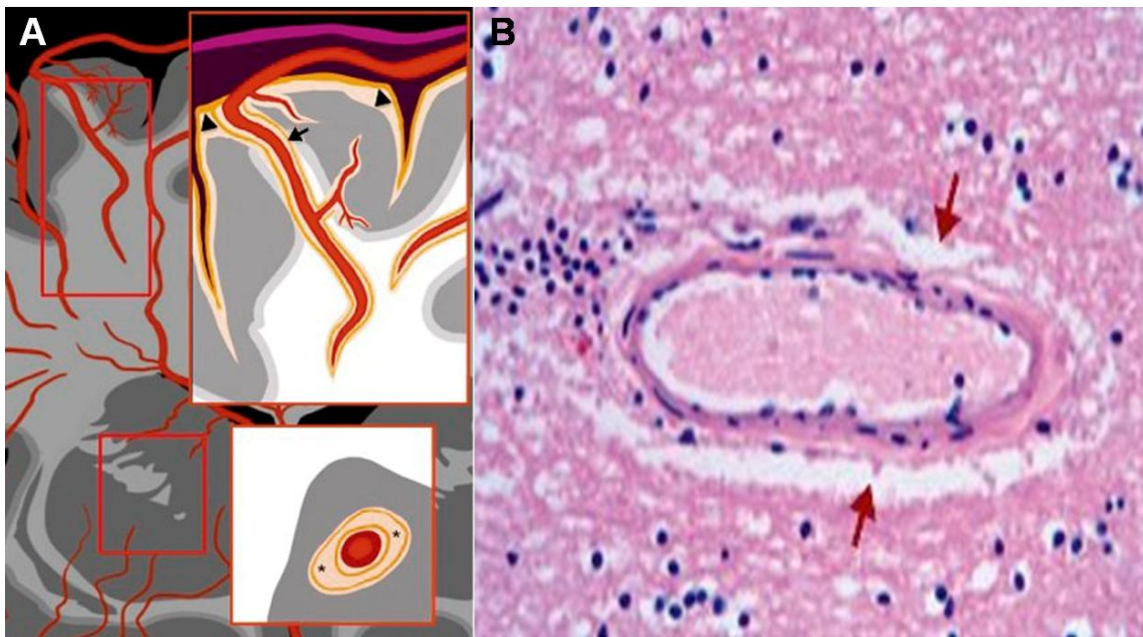
Las **LSB** son lesiones con señal de intensidad aumentada respecto a la sustancia blanca normal, en la secuencia ponderada en T2 y en FLAIR, y disminuida en la secuencia ponderada en T1. Se localizan en la sustancia blanca profunda y periventricular, en la sustancia gris de los ganglios de la base, en el tronco encefálico y sustancia blanca del cerebelo. Pueden ser lesiones focales, o extensas y confluyentes (cuando hay lesiones muy numerosas), con más o menos simetría. Todavía no se ha determinado si los mecanismos que conducen a las lesiones periventriculares o profundas son diferentes, o se trata solamente de diferentes estadios de progresión. La prevalencia de las LSB varía entre en 5 y 90% dependiendo del diseño del estudio, de la población, y de la escala de medida (de Leeuw, de Groot et al. 2001). Son lesiones muy comunes en los pacientes con ictus lacunar, y su presencia se asocia consistentemente con la de las demás lesiones de EPVC.

Los espacios perivasculares son aquellos que rodean las arterias perforantes pequeñas, donde drena el líquido intersticial y se visualizan en la RM cuando están dilatados (EPVD) (Wardlaw, Smith et al. 2013). Aparecen como lesiones de menos de 3mm de diámetro con señal de intensidad similar al LCR en las secuencias ponderadas en T2 y en T1.

Tienen forma redondeada o lineal en función del plano de la imagen, de modo que en el plano axial se identifican EPVD con forma redondeada en los ganglios de la base, y lineales en los centros semiovais. Tradicionalmente han sido menospreciados al considerarse meros artefactos del procesamiento del tejido.

Sin embargo, actualmente se ha descrito que la presencia de un gran número de EPVD es clínicamente relevante, puesto que se asocia con la presencia de LSB e ictus lacunar (Doubal, MacLulich et al. 2010), (Potter, Doubal et al. 2013), (Zhu, Tzourio et al. 2010). En la **figura 2** se muestra en detalle la estructura y localización de los EPVD.

Figura 2. Espacios perivasculares: localización y estructura.



A) Espacio perivascular en la piamadre, envuelto por una hoja leptomeníngea que lo separa del espacio subpial (flecha). Espacio perivascular en el núcleo lentículo-estriado, envuelto por dos hojas leptomeníngeas que lo separan del espacio subpial (cabezas de flecha en recuadro superior y asteriscos en recuadro inferior); B) detalle fotomicrográfico del espacio perivascular o de Virchow-Robin (flechas) (Figura adaptada de Medrano Martorell.S et al. (Medrano Martorell, Cuadrado Blazquez et al. 2012))

Los **microsangrados** son pequeñas hemorragias crónicas en el cerebro, causadas por defectos estructurales de los pequeños vasos cerebrales. Se detectan como depósitos de productos de degradación de la sangre (principalmente hemosiderina), cuyas propiedades paramagnéticas permiten su visualización mediante RM utilizando la secuencia en eco de gradiente T2 (T2*-gradient recalled echo o GRE) o de susceptibilidad (SWI). Se estima una prevalencia de entre 1 y 5% en pacientes con arterioesclerosis (Linn 2015). Aunque han sido menos estudiados, los microsangrados se relacionan de forma consistente con la presencia de otras lesiones en el contexto de EPVC (Cordonnier, Potter et al. 2009), (Wardlaw, Lewis et al. 2006), (Shoamanesh, Preis et al. 2015).

La **atrofia cerebral** es la pérdida de volumen cerebral, no relacionada con lesiones focales traumáticas o infartos. Se observa en la RM por el aumento del tamaño de las cisternas ventriculares y de los surcos, en relación al volumen intracraneal. Se trata de un proceso asociado al envejecimiento con gran variabilidad entre individuos, no obstante, en el contexto de enfermedad vascular y demencia, la atrofia se asocia a la pérdida neuronal, adelgazamiento cortical, patología vascular subcortical con rarefacción de la sustancia blanca, arterioloesclerosis, colagenosis venosa, y cambios neurodegenerativos secundarios (Jagust, Zheng et al. 2008).

La presencia de infartos lacunares, EPVD y microsangrados, se valora de forma cuantitativa (presencia, localización y/o número de lesiones). En cambio, las LSB se pueden valorar de forma cuantitativa o cualitativa. Pueden utilizarse una serie de escalas visuales semicuantitativas que puntúan el grado de afectación (habitualmente en ausente, leve, moderado o severo) en diferentes áreas cerebrales (Mantyla, Erkinjuntti et al. 1997).

Las escalas visuales más comunes son la *age-related white matter changes* o escala de Wahlund (ARWMC) (Wahlund, Barkhof et al. 2001), Fazekas (Fazekas, Chawluk et al. 1987), Scheltens (Scheltens, Barkhof et al. 1993), y la Rotterdam Scan Study (RSS) scale (de Leeuw, de Groot et al. 2001).

El principal inconveniente de las escalas visuales es la falta de consenso, se trata de un método poco sensible (van Straaten, Fazekas et al. 2006), y la fiabilidad depende en muchos casos, de la carga lesional (Wardlaw, Ferguson et al. 2004). La medida del volumen mediante segmentación de LSB es un método cuantitativo más sensible (Iorio, Spalletta et al. 2013), se lleva a cabo de forma automática con un software que calcula el volumen en base a un algoritmo definido previamente; o de forma semiautomática, en la que el investigador define de forma manual las lesiones y el software calcula el volumen correspondiente. Se ha descrito una buena correlación entre las medidas de volumen obtenidas con la segmentación automática, semiautomática, y las escalas visuales cuantitativas (Tiehuis, Vincken et al. 2008) (Wang, Li et al. 2014).

1.3 Biomarcadores:

1.3.1 Definición y aplicaciones:

Un biomarcador se define como una característica que puede ser medida de forma objetiva, y que además puede ser evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, patológicos, o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (2001). Los biomarcadores, se caracterizan por su especificidad (capacidad para detectar verdaderos negativos) y sensibilidad (capacidad para detectar verdaderos positivos), los cuales determinan su valor predictivo para una indicación concreta.

Se utilizan como una herramienta que proporciona información adicional sobre el riesgo, diagnóstico o pronóstico, a la aportada por los factores de riesgo clínicos y comorbilidades conocidas.

Los biomarcadores detectables en fluidos biológicos, podrían combinarse en dispositivos para una medición sencilla y rápida, lo cual facilitaría su aplicación práctica en la clínica.

1.3.2 Biomarcadores en el ictus:

El uso de biomarcadores en el ictus es relativamente reciente, pero ya se han descrito biomarcadores útiles para predecir el riesgo, o para establecer el diagnóstico y la etiología. Marcadores como la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2) y la proteína reactiva C (CRP), se han asociado al riesgo de primer ictus y evento recurrente (Garg, McClelland et al. 2015), (Cucchiara, Messe et al. 2009), (Delgado, Chacon et al. 2012). Una predicción más precisa del riesgo de ictus permitiría intensificar las medidas de prevención basadas en el control de factores de riesgo modificables, para intentar reducir la incidencia del ictus.

También se han descrito biomarcadores útiles para el diagnóstico del ictus y su etiología (Montaner, Mendioroz et al. 2010), (Garcia-Berrocoso, Fernandez-Cadenas et al. 2010).

1.3.3 Uso de biomarcadores en la enfermedad de pequeño vaso silente:

La investigación de biomarcadores en el contexto de la EPVC silente, se ha centrado en la búsqueda de candidatos para la predicción de la aparición de lesiones concretas (principalmente infartos lacunares y LSB) y/o su progresión, en estudios poblacionales o en poblaciones seleccionadas por factores de riesgo (por ejemplo, pacientes con DM, HTA, o con eventos cardiovasculares previos). Esto, ha conducido a que en la literatura se encuentre una gran diversidad y heterogeneidad de estudios relacionados con los biomarcadores en la EPVC, en función de la selección de los pacientes, del número de biomarcadores y lesiones analizadas. Por el contrario, los estudios de EPVD y microsangrados son mucho menos numerosos.

En términos generales se pueden clasificar los estudios realizados hasta la fecha según:

Tipo de población:

-Estudios de cohortes poblacionales (Aono, Ohkubo et al. 2007), (Aribisala, Wiseman et al. 2014), (Dadu, Fornage et al. 2013), (Cucchiara, Messe et al. 2009), (Wada, Nagasawa et al. 2008).

-Estudios de pacientes seleccionados por uno o más factores de riesgo (Reinhard, Garde et al. 2012), (Rouhl RP 2012), (Kario, Matsuo et al. 2001), (Economos, Wright et al. 2013).

Lesión de interés:

-Individual

- Varias lesiones combinadas

Análisis del estudio:

-Transversal: medida basal de la lesión radiológica y/o del biomarcador (Aono, Ohkubo et al. 2007), (Aribisala, Wiseman et al. 2014), (Wada, Nagasawa et al. 2008) (Reinhard, Garde et al. 2012), (Kario, Matsuo et al. 2001), (Delgado, Riba-Llena et al. 2014), (Gottesman, Cummiskey et al. 2009).

- Longitudinal: seguimiento de la progresión de las lesiones radiológicas y medida del biomarcador en un solo momento (habitualmente al inicio) (Dadu, Fornage et al. 2013), (Economos, Wright et al. 2013), (Kloppenborg, Geerlings et al. 2014), (Pradhan, Manson et al. 2001), (Pikula, Beiser et al. 2012).

Número de biomarcadores:

-Estudios de un biomarcador, o de genes candidatos.

-Paneles de biomarcadores o estudios de asociación del genoma completo (GWAS siglas del inglés Genome Wide Association Studies) (Debette, Bis et al. 2010).

Los biomarcadores más estudiados son los plasmáticos dada la simplicidad de la obtención de la muestra. También se han realizado estudios de marcadores en LCR, pero son mucho menos comunes.

1.3.3.1 Mecanismos relacionados con la fisiopatología de la EPVC:

Las vías más exploradas son los mecanismos de inflamación, daño endotelial, hemostasia, sistema renina–angiotensina-aldosterona y el metabolismo de lípidos.

Inflamación:

Los procesos inflamatorios son un componente clave en las enfermedades cerebrovasculares y neurodegenerativas (Sullivan, Sarembock et al. 2000), (Amor, Peferoen et al. 2014). La inflamación podría contribuir a la enfermedad cerebral silente a través procesos aterogénicos, de inflamación de bajo grado, y de agregación plaquetaria, los cuales son mediados por citoquinas, moléculas de adhesión leucocitaria, quimiocinas, factores de crecimiento y lípidos (Sullivan, Sarembock et al. 2000).

La proteína reactiva C (CRP) y la Interleucina-6 (IL-6) son los biomarcadores de inflamación más estudiados y descritos en el contexto de las enfermedades cerebrovasculares. La CRP es un reactante de fase aguda que se sintetiza en el hígado en respuesta a IL-6, y ha sido ampliamente utilizada como marcador de inflamación vascular. Se ha asociado con la patogénesis de la arteriosclerosis, el desarrollo de la diabetes mellitus, hipertensión, síndrome metabólico y con la aparición de eventos cardiovasculares (Pradhan, Manson et al. 2001), (Ridker 2001), (Cesari, Penninx et al. 2003), (Sesso, Buring et al. 2003). Las células T y los macrófagos, secretan IL-6 para estimular la respuesta inmune, además las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, la producen como una citoquina pro-inflamatoria. Se asocia con infarto de miocardio, ictus, muerte de causa cardiovascular, y enfermedad arterial periférica.

En la placa aterosclerótica vulnerable, los macrófagos expresan una enzima lipasa que circula unida a lipoproteínas de baja densidad (LDL), denominada fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2). Ésta molécula, tiene un papel pro-inflamatorio pues produce precursores del ácido araquidónico (quimiotaxis de monocitos y macrófagos) e hidroliza fosfolípidos oxidados que promueven la disfunción endotelial, y la formación del núcleo necrótico de la placa.

Disfunción endotelial:

El endotelio tiene un papel clave en la regulación de homeostasis vascular cerebral, muchos factores pueden alterar su funcionamiento y causar disfunción endotelial, la cual se considera una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y la arteriosclerosis.

La disfunción endotelial es el resultado de procesos de isquemia/reperfusión e inflamación que se dan de forma persistente, y conllevan estrés oxidativo. Éste se debe a la alteración en la producción de radicales libres, que conduce a la formación de peroxinitritos, peroxidación de lípidos, modificación de proteínas, activación de metaloproteinasas y daño del ácido desoxirribonucleico (ADN).

La conjunción de factores de riesgo vascular, estrés oxidativo y estímulos proinflamatorios (quimiocinas, citoquinas, moléculas de adhesión que interactúan con leucocitos y plaquetas), conducen a la disfunción endotelial. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica se altera, de modo que aumenta la infiltración de moléculas tóxicas circulantes al parénquima cerebral, y se dan cambios protrombóticos. Los biomarcadores de daño endotelial más descritos son las moléculas de adhesión intercelular y celular vascular (ICAM-1, VCAM-1), las selectinas E y P (E-selectin, P-selectin), homocisteína (HCY), dimetilarginina asimétrica (ADMA), fragmentos 40 y 42 de péptidos amiloides, y el ratio albúmina/creatinina en orina.

La microalbuminuria, se define por la presencia de una ratio albúmina /creatinina en orina >21 mg/g in hombre y >30 en mujeres (Mancia, De Backer et al. 2007). La albúmina es una proteína que se encuentra muy concentrada en sangre. Cuando existe una lesión o enfermedad renal, o en enfermedades crónicas como DM o HTA, la concentración de ésta proteína en orina aumenta. La creatinina es una proteína derivada del metabolismo muscular que se excreta de forma constante a la orina, y se utiliza como factor de corrección para la albúmina, cuando la orina se ha recogido en una muestra aleatoria. También se puede medir éste ratio en una muestra de orina de 24 horas. Se dice por tanto, que el ratio albúmina creatinina es un marcador de daño renal. Dada la similitud anatómica y hemodinámica de los vasos pequeños en el cerebro y en el riñón, un marcador de daño renal subclínico como es la microalbuminuria, podría serlo también de EPVC..

Coagulación y fibrinólisis:

Las vías de coagulación y de fibrinólisis se relacionan con el estado del endotelio y con las vías de inflamación. El papel del activador tisular del plasminógeno (t-PA) en la patogénesis del ictus ha sido ampliamente descrito.

En la EPVC los marcadores de hemostasia han mostrado resultados menos consistentes que los marcadores de otras vías.

Sistema renina-angiotensina-aldosterona:

Tiene un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, así como en la función endotelial y la proliferación y el tono de las células musculares lisas (Hassan, Lansbury et al. 2002).

Matriz extracelular:

Es otro componente clave en la fisiología del cerebro. Las metaloproteinasas de matriz, son proteínas secretadas por neuronas y células gliales, entre otras. Tienen un papel importante en el procesamiento, no sólo de proteínas de la matriz, sino también de proteínas neuronales estructurales y citoquinas.

Metabolismo de lípidos:

Constituye un elemento importante, dados los factores de riesgo anteriormente expuestos para la EPVC, no obstante el valor diagnóstico de los biomarcadores de ésta vía no se ha establecido de forma consistente.

Otras vías:

Otros biomarcadores de interés que no se clasifican en los grupos anteriores, pero que merecen atención, por su relación con los factores de riesgo para EPVC son el péptido natriurético cerebral y su fragmento N terminal (BNP y NT-proBNP), las troponinas cardíacas y el ácido úrico.

El NT-proBNP es un marcador de daño cardíaco subclínico, se produce en respuesta al estrés de la pared del miocardio. Dados los factores de riesgo y mecanismos comunes entre las enfermedades cerebrovascular y cardiovasculares, se piensa que podría ser marcador de daño cerebral subclínico también (Bezerra, Sharrett et al. 2012), (Kim, Lee et al. 2011).

También se consideran marcadores de daño cardíaco subclínico, la troponina cardíaca T ultrasensible (Hs-cTnT) y el BNP, se describió la relación de ambas con la presencia de ICS y progresión de LSB en el estudio ARIC (Dadu, Fornage et al. 2013).

El ácido úrico se asocia con niveles sanguíneos elevados de triglicéridos, colesterol y glucosa, y con el síndrome metabólico. Los efectos beneficiosos del ácido úrico se han descrito en modelos animales de ictus agudo, e incluso hay un ensayo clínico sobre los efectos neuroprotectores en pacientes de ictus humanos. Sin embargo, la relación con la EPVC está muy poco explorada. (Heo and Lee 2010), (Shih, Chen et al. 2012).

Los n-glicanos son componentes esenciales en procesos de reconocimiento célula-célula y célula-matriz, modulando fenómenos de adhesión, secreción y diferenciación. Son oligosacáridos con estructura básica $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, que son añadidos durante la síntesis de proteínas sobre la secuencia Asn-X-Ser/Thr, (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro), estableciéndose un enlace covalente entre el (-NH) del Asn y el primer oligosacárido que siempre es N-acetilglucosamina.

Muestran una gran variabilidad estructural, y en un mismo tipo celular (Vanhooren, Navarrete Santos et al. 2015), el perfil químico de los glicanos puede ser modificado a lo largo del tiempo, de éste modo, son candidatos ideales para modular los procesos en que participan. Los efectos directos sobre las proteínas, radican en el plegamiento de las mismas (Helenius 1994), de ahí que sea difícil asignar un rol específico a un glicano en concreto.

Biomarcadores de líquido cefalorraquídeo (LCR):

El LCR se produce en los plexos coroideos desde la circulación cerebral y circula por los ventrículos y cisternas del cerebro, y por la médula espinal, para volver a la circulación sistémica. En él encontramos un perfil bioquímico que estaría reflejando los procesos agudos o degenerativos en el cerebro. No obstante, los estudios que utilizan éste tipo de muestra en el contexto de la EPVC son poco numerosos pues están más enfocados al deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer (EA) y su diferenciación con otras demencias.

Marcadores genéticos:

La EPVC se presenta más a menudo como una enfermedad esporádica asociada con hipertensión y envejecimiento, que como una enfermedad monogénica (CADASIL o Fabry); sin embargo, se sabe que, en un alto porcentaje de casos, algunas características de su patología como las LSB, tienen un componente hereditario (Schmidt, Schmidt et al. 2006), (Paternoster, Chen et al. 2009).

Los estudios de genes candidatos, se basan en la búsqueda de la asociación de una variante genética específica con un fenotipo concreto (Paternoster, Chen et al. 2009), (Lyll, Munoz Maniega et al. 2015). Pero en los últimos años, se han desarrollado y popularizado los GWAS. Éste tipo de análisis permite detectar asociaciones genéticas en enfermedades comunes al combinar resultados de cohortes diferentes en meta análisis. De éste modo se puede identificar cualquier vía alterada, no sólo aquellas que se identifican por la literatura (Debette, Bis et al. 2010).

Hipótesis 2

Basándonos en lo expuesto anteriormente, nos planteamos las siguientes hipótesis:

El uso de marcadores plasmáticos podría ser útil para la identificación de los sujetos de mayor riesgo de presentar un infarto cerebral silente y otras lesiones de la enfermedad de pequeño vaso cerebral. Con ello se facilitaría la toma de decisiones a la hora de realizar pruebas de imagen cerebral (fundamentalmente resonancia magnética cerebral) para el diagnóstico precoz de la enfermedad de pequeño vaso cerebral en sujetos de riesgo, susceptibles de recibir tratamiento en un futuro para disminuir las complicaciones de la enfermedad.

Por otra parte, la identificación de la asociación entre los marcadores biológicos y las lesiones de la enfermedad de pequeño vaso cerebral podría ser de ayuda para la definición de los mecanismos subyacentes, de nuevas dianas terapéuticas y la monitorización de la evolución de la enfermedad.

Objetivos 3

- 1) Realizar una revisión de la literatura acerca de los biomarcadores asociados con la presencia de lesiones de la enfermedad cerebrovascular silente.

- 2) Estudiar la asociación entre diversos marcadores de interés (fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas, N-glicanos y NT-proBNP) y la presencia de infartos cerebrales silentes, así como su aportación a la capacidad predictiva sobre un modelo de factores clínicos.

- 3) Estudiar la asociación entre los marcadores anteriores y el volumen o grado de severidad de las lesiones de la sustancia blanca cerebral.

- 4) Calcular una escala ordinal combinando la presencia simultánea de varios marcadores de pequeño vaso cerebral y describir su asociación con los factores de riesgo vascular y biomarcadores estudiados.

Metodología 4

4.1 Estudio ISSYS

4.1.1 Objetivos del estudio:

El estudio ISSYS (siglas del inglés, *Investigating Silent Strokes in hYpertensives, a magnetic resonance imaging Study*) es un estudio de diseño observacional prospectivo, cuyos objetivos generales son determinar **la prevalencia e incidencia de las lesiones cerebrovasculares silentes** y del deterioro cognitivo en una cohorte de pacientes hipertensos de entre 50 y 70 años de edad, sin antecedentes de ictus o demencia, procedentes de los centros de atención primaria que dependen del Hospital Vall d'Hebron.

Para alcanzar estos objetivos, en primer lugar, se realizó una estimación del tamaño muestral necesario para obtener una prevalencia del 10% de ICS con un intervalo de confianza del 95% y una precisión del 2% (n=865). Se decidió incluir un 20% más de pacientes para no perder potencia estadística a causa de la pérdida potencial de participantes en el curso de la inclusión, realización de pruebas o en el seguimiento, reclutándose finalmente un total de 1037 individuos.

En ésta tesis se describen los resultados obtenidos de un corte transversal de la cohorte en el momento de la recogida inicial de datos y muestras de sangre y de orina, que se llevó a cabo entre noviembre de 2010 y mayo de 2012.

Se realizó un muestreo aleatorio y estratificado por prevalencia de HTA según edad y sexo, para identificar los sujetos potencialmente elegibles, que posteriormente fueron invitados a participar en el estudio por vía telefónica.

Los criterios de inclusión fueron: edad entre 50 y 70 años; tener HTA esencial diagnosticada por lo menos un año antes; y firmar el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron: haber tenido un ictus o demencia previos, tener una contraindicación para realizarse la RM cerebral, existir sospecha de hipertensión de bata blanca, o tener una neoplasia u otra enfermedad concomitante que limite la esperanza de vida a corto plazo.

4.1.2 Visita basal:

Los pacientes seleccionados, que accedieron a participar en el estudio de forma voluntaria, fueron citados a una visita presencial en la que se comprobó que cumplían los criterios de inclusión. Ésta visita basal consistió en la recogida de datos clínicos (incluyendo los antecedentes de enfermedad vascular, tratamiento y cumplimiento terapéutico), medición de presión arterial y variables antropométricas, estudio vascular periférico de rigidez arterial, monitorización de la presión arterial ambulatoria, evaluación cognitiva y RM cerebral. Para descartar la presencia de un ictus previo, se revisaron las historias clínicas y adicionalmente, se administró una adaptación del Stroke Symptom Questionnaire (Berger, Hense et al. 2000). Además se recogió una muestra de sangre y orina para el estudio de biomarcadores, que es el objeto principal de esta tesis doctoral.

Se estimó el riesgo cardiovascular global mediante la adaptación de la ecuación derivada del estudio Framingham a nuestra población, con el índice del *REgistre Glroní del COR* (REGICOR). Éste índice de riesgo, incluye las variables de edad, sexo, tabaquismo, DM, cifras de presión arterial y de colesterol.

Los pacientes se clasifican en función del riesgo a 10 años de sufrir un evento coronario según las categorías: riesgo bajo (<5%), riesgo moderado (5-9,9%), riesgo elevado (10-14,9%), riesgo muy elevado (>15%) (Marrugat, Subirana et al. 2007).

4.1.2.1 Resonancia magnética:

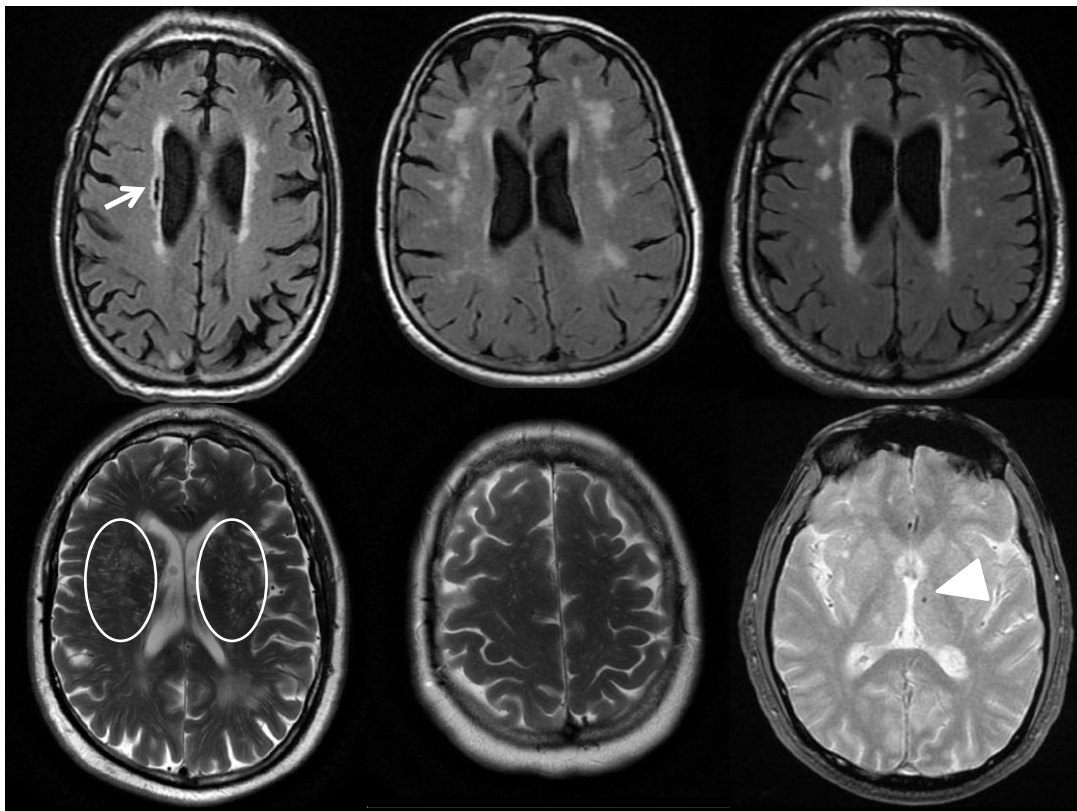
La RM cerebral se llevó a cabo en todos los pacientes del estudio, exceptuando a aquellos que presentaban contraindicaciones para realizarse la prueba; en la mayoría de casos se trataba de claustrofobia o por la presencia de piezas metálicas desconocidas a nivel craneofacial en el momento de seleccionarlos. Se consiguieron 976 pacientes con el estudio de resonancia magnética válido. Todas las resonancias se practicaron en el mismo resonador de 1,5 Teslas (T) (Signa HDx 1-5, General Electric, Waukesha, WI) en el mismo centro.

Se obtuvieron imágenes ponderadas en T1 en plano axial y sagital. Además se obtuvieron imágenes en FLAIR, en secuencia en eco de gradiente T2 (T2*-gradient recalled echo or GRE) y ponderadas en T2, en planos axiales.

Todas las imágenes fueron examinadas por dos neurorradiólogos y por un neurólogo experto en patología cerebrovascular, para determinar la presencia de lesiones y su localización. Se obtuvo una buena concordancia entre las lecturas, y los desacuerdos fueron solucionados por consenso.

En la **figura 3** se muestran ejemplos representativos de las lesiones que se consideraron en el estudio, como se describe a continuación.

Figura 3. Ejemplos representativos de las lesiones examinadas en el estudio ISSYS.



En la fila superior se muestran tres imágenes obtenidas en secuencia FLAIR, la de la izquierda muestra un infarto silente subcortical (flecha); la del centro muestra LSB confluyentes; la de la derecha muestra LSB periventriculares confluyentes y LSB focales de localización profunda. En la fila inferior: la imagen de la izquierda obtenida en secuencia ponderada en T2, se muestran EPVD en los ganglios de la base (círculos); la imagen del centro en secuencia ponderada en T2 muestra EPVD en los centros semioviales; la imagen de la derecha obtenida en secuencia en eco de gradiente T2*, muestra un microsangrado localizado en el tálamo izquierdo (cabeza de flecha).

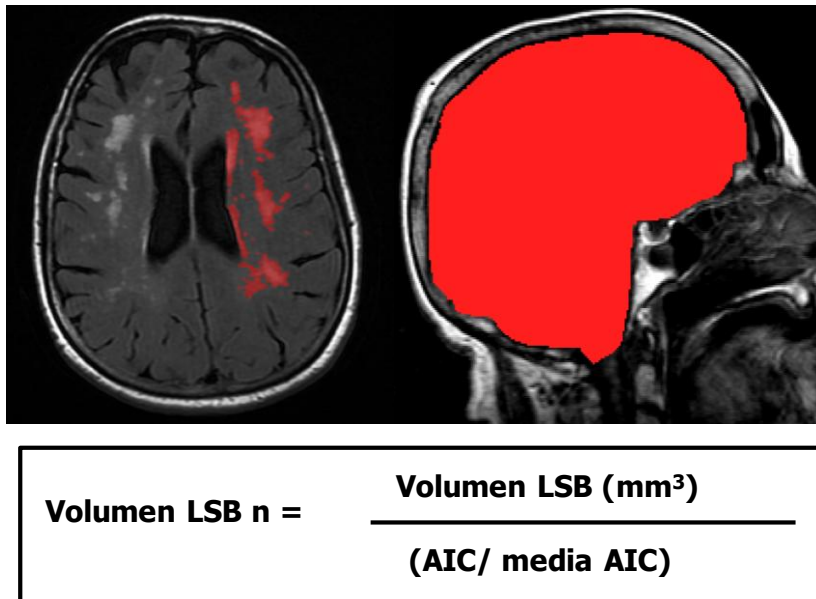
Criterios diagnósticos para las lesiones de interés en la RM del estudio:

Los ICS se definieron como lesiones cavitadas de tamaño igual o superior a los 3 mm en su máximo diámetro, que muestran una señal de intensidad similar al del líquido cefalorraquídeo (LCR) en todas las secuencias de la RM (hipointensa en T1, hiperintensa en T2 e hipointensa en FLAIR) y con halo hiperintenso de gliosis alrededor de la lesión en la secuencia FLAIR. Se localizan de forma predominante en los ganglios de la base, en la sustancia blanca subcortical, y algunos, en la corteza cerebral. Las lesiones localizadas en áreas con alta prevalencia de EPVD, como la región inferior de los ganglios de la base, no se consideraron como ICS. (Delgado, Riba-Llena et al. 2014).

Las LSB se consideraron como lesiones hiperintensas en T2 y en FLAIR, e isointensas o hipointensas en la secuencia ponderada en T1. Se valoraron las lesiones localizadas en la sustancia blanca profunda y periventricular, en la sustancia gris de los ganglios de la base, en el tronco encefálico y sustancia blanca del cerebelo. Se definieron como lesiones focales, o extensas y confluyentes, con más o menos simetría. Para evaluar la severidad se utilizó la escala visual de Fazekas (Fazekas, Chawluk et al. 1987). Esta escala permite cuantificar de una forma simple la cantidad de LSB, se divide la sustancia blanca en localización periventricular y profunda y se asignan grados del 0 al 3 en cada caso, en función del tamaño y confluencia de las lesiones.

- LSB periventricular, grado 0: ausencia de lesiones; grado 1: capuchones o *líneas del grosor de un lápiz*; grado 2: halo ténue; 3: señal irregular periventricular que se extiende a la sustancia blanca profunda.
- LSB profunda: grado 0: ausencia de lesiones; grado 1: focos puntiformes; grado 2: confluencia incipiente; grado 3: áreas grandes de confluencia.

Figura 4. Representación de la obtención de los valores estandarizados de volumen de LSB.



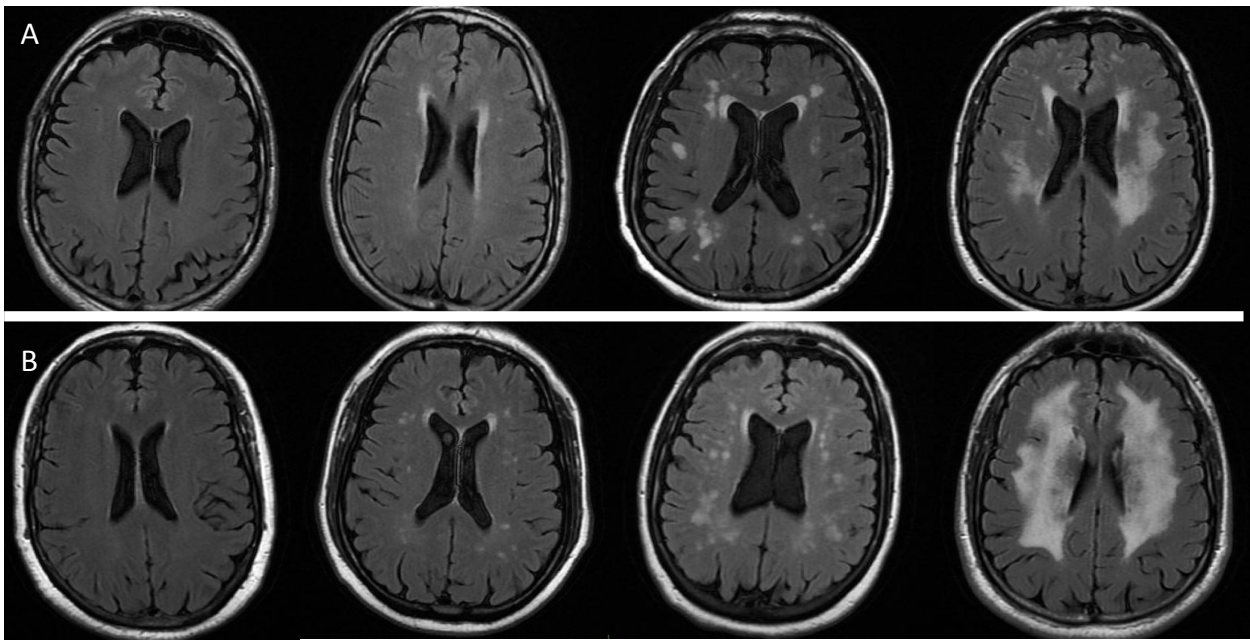
Además, en una muestra de la cohorte se midió el volumen de LSB mediante segmentación semiautomática, utilizando el software ITK-SNAP (www.itksnap.org) (Yushkevich, Piven et al. 2006). En secuencia FLAIR las regiones hiperintensas de interés (ROI del inglés *region of interest*) se delimitaron de forma manual en el programa, para obtener el volumen correspondiente en centímetros cúbicos calculado de forma automática por el programa mediante un algoritmo. Se estimó el volumen intracraneal mediante la fórmula: Área intracraneal (AIC) = Área sagital de dos cortes centrales / 2 * grosor de los cortes)*1000.

El volumen obtenido fue estandarizado con el valor medio del volumen intracraneal total de todos los pacientes en que se midió el volumen de LSB.

En la figura 4 se muestra un ejemplo de segmentación de LSB realizada el programa mencionado, las áreas en color rojo fueron seleccionadas de forma manual, en la figura se observa la selección en el hemisferio izquierdo y en un corte sagital.

En la **figura 5** se muestran imágenes representativas de los grados de LSB en la escala Fazekas según la localización del 0 al 3 en cada caso.

Figura 5. Grados de la escala Fazekas en localización periventricular y profunda.



En el panel A, se muestran imágenes representativas de cada grado de LSB en localización periventricular según la escala Fazekas: de izquierda a derecha los grados de 0 a 3. En el panel B, se muestran imágenes representativas de cada grado de LSB en localización profunda según la escala Fazekas: de izquierda a derecha los grados de 0 a 3. Todas son imágenes obtenidas en la secuencia FLAIR.

Los EPVD se consideraron como lesiones definidas, con forma redondeada en los ganglios de la base, y lineal en la sustancia blanca subcortical en plano axial / centros semioviales, con señal de intensidad en la RM similar a los infartos, pero con un tamaño menor (menos de 3mm de diámetro), y sin halo de gliosis. Se asignaron puntuaciones para los EPVD en los ganglios de la base y en los centros semioviales: 0 (ninguno), 1(1-10), 2 (11-20), 3 (21-40) y 4 (>40), como se había descrito previamente (Potter, Doubal et al. 2013).

Los microsangrados fueron definidos como lesiones redondeadas de menos de 10mm de diámetro, hipointensos en la secuencia en eco de gradiente T2 (*T2*-gradient recalled echo* o GRE) (Roberts and Mikulis 2007) (Fan, Mok et al. 2004).

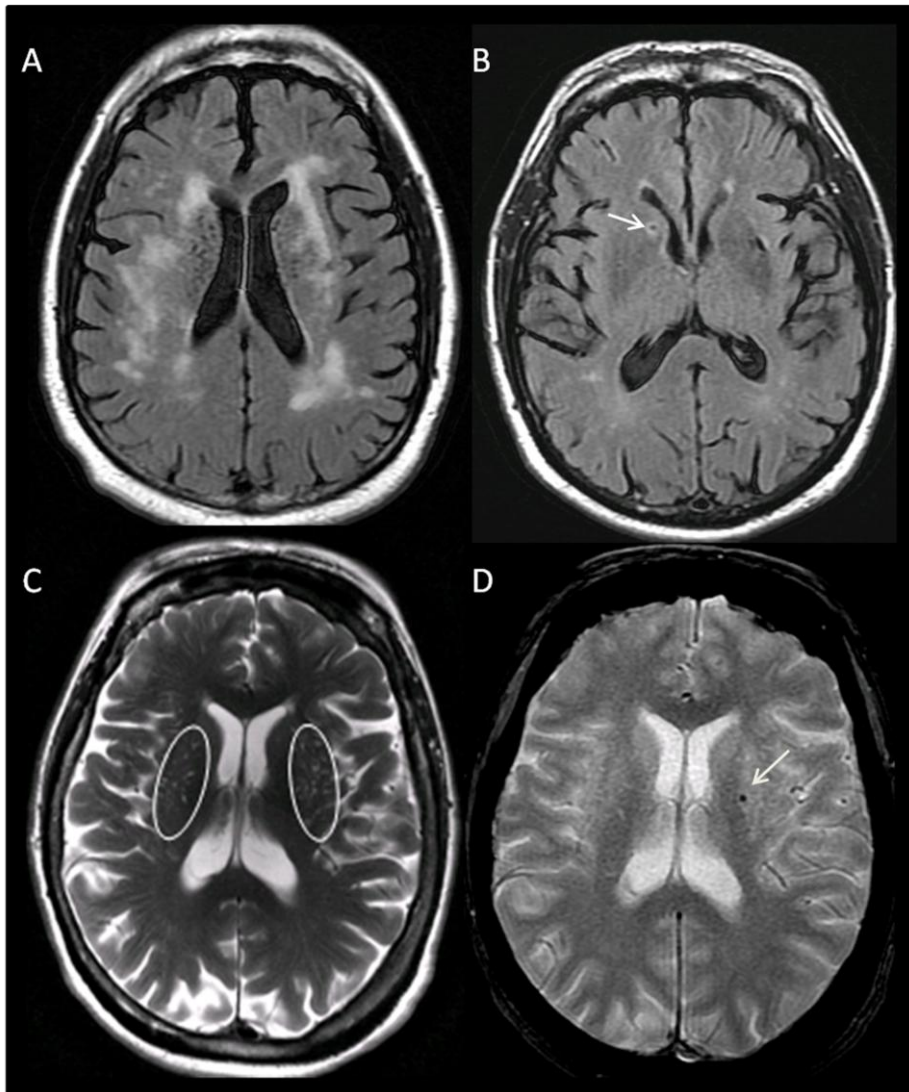
Se distinguieron las localizaciones lobar (unión de la sustancia blanca y gris de la corteza, sustancia blanca subcortical), profunda (sustancia gris de los ganglios de la base, cápsulas externa e interna y tálamo), e infratentorial (cerebelo y tronco encefálico) (Cordonnier, Potter et al. 2009).

Con las lesiones definidas anteriormente, se elaboró una escala ordinal de carga de marcadores de EPVC, como había sido descrito previamente (Klarenbeek, van Oostenbrugge et al. 2013), (Xiao, Lan et al. 2015). Para ello se asignó un punto por la presencia de cada una de las siguientes lesiones: 1) lagunas (lesiones con intensidad e señal similar a la del LCR en todas las secuencias, con anillo hiperintenso rodeando la lesión en la secuencia FLAIR, localizadas **en el territorio de las arterias perforantes**, con un diámetro comprendido entre 3 y 20mm); 2) LSB **extensas** cuantificada en FLAIR, se consideraron puntuaciones de 3 en áreas periventriculares y de 2 a 3 puntos en la sustancia blanca profunda (escala Fazekas); 3) EPVD, se asignaron puntuaciones 0 (menos de 10 EPVD), y 1 o **presencia moderada** (más de 10 EPVD); 4) microsangrados **de las áreas profundas** (ganglios de la base, tálamo y cápsulas interna y externa). En la **figura 6** se muestran imágenes representativas de los componentes de la escala de carga de EPVC.

Dicha escala pretende cuantificar la existencia simultánea de aquellas lesiones radiológicas causadas por una enfermedad de pequeño vaso de origen arterioloesclerótico.

Todas las lesiones se identificaron siguiendo las recomendaciones del grupo STRIVE (Wardlaw, Smith et al. 2013)

Figura 6. Lesiones representativas de los componentes de la escala de carga de EPVC.



En la primera fila se muestran imágenes de secuencia FLAIR con LSB periventriculares extensas (A), e infarto lacunar en el núcleo estriado (B). En la segunda fila se observan en imágenes de secuencia T2 y T1 respectivamente, con EPVD en los ganglios basales (círculos en C), y un microsangrado en el núcleo estriado izquierdo (flecha en D).

4.1.2.2 Recogida y procesamiento de muestras biológicas:

Se recogieron muestras de sangre periférica y en ayunas, para obtener el perfil hematológico y bioquímico básico, en el servicio de Bioquímica del Hospital Vall d'Hebron (hemoglobina, recuento leucocitario y plaquetario, glucosa, colesterol total, creatinina, sodio, potasio, y función hepática).

Además se obtuvieron 3 tubos con anticoagulante EDTA, 2 con anticoagulante citrato y 2 sin anticoagulante. Se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm y a temperatura ambiente, para separar y obtener suero y plasma. Adicionalmente, se recogieron 500ul de la fracción blanca o *buffy coat* que queda entre el plasma y los restos celulares en los tubos con EDTA centrifugados y se conservaron para la extracción de ADN, y por otro lado, en tubos con 1,5ml de *RNA Later (Ambion)*, para la extracción posterior de ARN. Todas estas muestras se alicuotaron y se almacenaron a -80°C para el estudio posterior de biomarcadores. Por último, se recogió una muestra de orina y se envió al laboratorio central para la determinación del ratio albúmina creatinina.

4.2 Estudio de biomarcadores en el ISSYS:

A partir de la revisión de la literatura sobre los biomarcadores asociados a la enfermedad cerebrovascular silente, se seleccionaron marcadores candidatos para el análisis en toda la cohorte del ISSYS. Los marcadores fueron seleccionados con base en su novedad en el contexto de la EPVC y por su potencial a nivel molecular.

La actividad de la lipoproteína fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) es un marcador establecido para riesgo de enfermedad coronaria. Además ha sido analizado su papel, en relación a la aparición de nuevos eventos en pacientes con un evento isquémico transitorio (Massot, Pelegri et al. 2011), (Delgado, Chacon et al. 2012).

Tanto la masa (concentración total), como la actividad de Lp-PLA2, han sido descritas como marcadores predictores del riesgo cardiovascular, pero hasta la fecha, sólo un estudio ha analizado la relación de la actividad de Lp-PLA2 con las LSB y se desconoce si podría ser útil en el diagnóstico de los ICS (Shoamanesh, Preis et al. 2015).

Los N-glicanos son un conjunto muy heterogéneo de oligosacáridos que se unen a las proteínas y lípidos en los procesos de modificación post-traduccionales. Dada su implicación en el plegamiento de proteínas, podrían ser biomarcadores candidatos para mejorar la predicción de múltiples enfermedades. De hecho, ya se han descrito determinados N-glicanos en asociación con enfermedades crónicas como el carcinoma hepatocelular (Vanhooren, Liu et al. 2009) y la diabetes mellitus de tipo 2 (Testa, Vanhooren et al. 2015). Además se ha descrito su relación con el envejecimiento (Ruhaak, Uh et al. 2011), (Vanhooren, Dewaele et al. 2010) y enfermedades neurodegenerativas como la EA (Schedin-Weiss, Winblad et al. 2014), (Wang, Liu et al. 2014).

En respuesta al estrés mecánico, se produce la ruptura de la prohormona del péptido natriurético cerebral (pro-BNP) en los cardiomiocitos, y se libera el fragmento inactivo N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) junto con el péptido activo BNP. El NT-proBNP es un biomarcador establecido para el diagnóstico del fallo cardíaco (Roberts, Ludman et al. 2015), así como para eventos cardiovasculares, y un marcador pronóstico para la mortalidad a largo plazo en la población general, y también en pacientes hipertensos (Paget, Legedz et al. 2011), (Bielecka-Dabrowa, Gluba-Brzozka et al. 2015), diabéticos (van der Horst, de Boer et al. 2010), o con enfermedad coronaria (Kleber, Goliash et al. 2014). El NT-proBNP se considera un marcador de daño cardíaco subclínico, y, dado que las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares comparten factores de riesgo y mecanismos fisiopatológicos comunes, se hipotetiza que podría ser un marcador de daño cerebral subclínico (Bezerra, Sharrett et al. 2012), (Kim, Lee et al. 2011).

La microalbuminuria es un marcador de daño renal subclínico a nivel de endotelio, como se describió previamente, es un factor de riesgo para la presencia de ICS en nuestra población (Delgado, Riba-Llena et al. 2014). El daño endotelial renal es uno de los procesos fisiopatológicos asociados a la enfermedad de pequeño vaso. La asociación entre la microalbuminuria y la presencia de ICS, podría indicar que el mecanismo que conduce al fallo endotelial es similar a nivel renal y cerebral.

Considerando estos precedentes, se llevaron a cabo las determinaciones de: los valores de actividad de Lp-PLA2 (N=921 pacientes), el perfil de N-glicosilación (N= 972 pacientes), y la concentración de NT-proBNP (N=278 pacientes). El ratio albúmina creatinina, a partir del cual se obtiene la microalbuminuria, es uno de los parámetros que se obtuvieron en la visita basal del estudio (N= 975 pacientes).

4.2.1 Técnicas de laboratorio utilizadas en esta tesis:

4.2.1.1 ELISA

El ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (**ELISA**), permite cuantificar una proteína determinada a partir de muestras de suero y /o plasma. El principio básico, consiste en la formación de conjugados de antígeno y anticuerpo, uno de los componentes está marcado con un enzima, e insolubilizado en un soporte (inmunoabsorbente). La reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y, puede ser fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

ELISA sándwich: el pocillo o tubo donde tendrá lugar la reacción viene recubierto o precotinado con un anticuerpo anti-antígeno que retendrá el antígeno presente en la muestra. Se lava el material no retenido de la muestra, y se incuba con el anticuerpo anti-antígeno marcado.

Finalmente, el antígeno se encuentra retenido a la fase sólida, y por otro lado unido a un anticuerpo marcado. Esta modalidad tiene una gran sensibilidad y especificidad.

Para la determinación de NT-proBNP en muestras de plasma se utilizó un ensayo de inmunoabsorción por electroquimioluminiscencia (**ECLIA**): se trata de un ensayo de tipo sándwich que consiste en la formación de complejos entre el anticuerpo anti-NT-proBNP que está biotinilado, el NT-proBNP presente en la muestra, y un segundo anticuerpo anti-NT-proBNP marcado con quelato de rutenio (Quelato Tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II)). En el tubo se incorporan micropartículas magnéticas (fase sólida) cubiertas de estreptavidina que se unen a la biotina del complejo. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo *ProCell/ProCell M*. Al aplicar una corriente eléctrica definida, se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva patrón. Las medidas no se hicieron por duplicado y los coeficientes de variación totales tuvieron valores menores de 3% (determinados con los controles internos del kit).

4.2.1.2 Ensayo enzimático de actividad:

El ensayo enzimático de actividad **PLAC Test for Activity** (*diaDexus Inc.*) es un ensayo de actividad de inmunocaptura híbrida, que consiste en la hidrólisis por la Lp-PLA2 presente en la muestra, de la posición sn-2 del sustrato, 1-miristoil-2-(4-nitrofenilsuccinil) fosfatidilcolina, dando lugar a un producto de reacción coloreado, 4-nitrofenol. La velocidad de formación de 4-nitrofenol se sigue por espectrofotometría y la actividad de Lp-PLA2 se calcula a partir de la velocidad de cambio de la absorbancia.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada en la que se ajusta el cambio de absorbancia frente a los niveles de actividad de Lp-PLA2 en nmol/min/mL. El coeficiente de variación (CV %) intraensayo fue menor de 2,5% en las concentraciones más elevadas y más bajas, y la medición no se hizo por duplicado dado que el coeficiente de variación inter-ensayo fue también bajo. Para 51 muestras no se obtuvieron resultados válidos debido a un exceso de turbidez o hemólisis en la muestra.

4.2.1.3 DSA-FACE (del inglés DNA Sequencer Adapted-Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis):

La técnica **DSA-FACE** para la obtención del perfil de N-glicosilación sérico, consiste en la derivatización de los extremos reductores con ácido comercial 8-Amino-1,3,6-PirenoTriSulfónico (APTS) (*Molecular Probes, Eugene, OR, USA*), y su separación en un secuenciador de ADN basado en la electroforesis capilar. Se trata de un método con alta sensibilidad, y que puede diferenciar glicanos estereoisómeros isobáricos. Las muestras se preparan en placas de 96 pocillos, y la lectura se realiza en un secuenciador de ADN común.

En primer lugar se separaron los N-glicanos de las proteínas de la muestra mediante digestión con N-glicosidasa del péptido F comercial (*PNGase F*) (*New England Biolabs, MA, USA*), que actúa sobre la mayoría de oligosacáridos de mamíferos unidos por enlace N. Se marcaron los N-glicanos con extremos reductores con ácido comercial 8-Amino-1,3,6-PirenoTriSulfónico (APTS) (*Molecular Probes, Eugene, OR, USA*) y se desializaron con la hidrolasa exoglicosidasa (sialidasa obtenida de *Arthrobacter ureafaciens*) (*Roche, Indianapolis, IN, USA*). Finalmente se separaron en el secuenciador de DNA basado en electroforesis capilar ABI 3130.

Los datos se analizaron con el *GeneMapper version 3.7 software (Applied Biosystems)* para obtener los valores normalizados de picos de glicosilación, del 1 al 9, los cuales representan concentraciones relativas de los oligosacáridos más prominentes en el plasma humano.

4.2.1.4 Inmunoturbidimetría:

La determinación de **albúmina y creatinina en orina** se llevó a cabo en el analizador *AU5800 de Beckman Coulter*. La determinación de microalbúmina (excreción de albumina en orina aumentada) se basa en un método de **inmunoturbidimetría**, que consiste en la aglutinación de partículas de látex marcadas con anticuerpos anti-albúmina humana debido a la unión de la proteína presente en la muestra. El cambio de absorbancia en la muestra debida a la aglutinación, es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y se calcula por comparación con los valores del calibrador de la proteína con concentración establecida. La determinación de creatinina se basa en el **método de Jaffé compensado**, un método colorimétrico que consiste en la formación de complejos en la reacción de la creatinina con ácido pícrico en un pH alcalino, los cuales que provocan un cambio de la absorbancia de la muestra que es proporcional a la concentración de creatinina.

4.3. Herramientas estadísticas.

Para determinar la asociación de un biomarcador con una indicación como por ejemplo la presencia de ICS, se utilizan estadísticos sencillos que contrastan la hipótesis de asociación, con la de no asociación, normalmente llevan preestablecido un mínimo del 95% de probabilidad de acierto, para obtener una significación estadística o p valor conocido. Las pruebas más conocidas para testar las variables continuas son la t de *student* para variables con distribución normal, y la U de Mann-Whitney para variables no normales. En el caso de confirmarse la hipótesis de asociación, el valor del biomarcador se demostrará mediante el uso de análisis más complejos.

4.3.1 Comparaciones múltiples:

Cuando se ponen en práctica múltiples comparaciones, como en el caso del análisis de la asociación de características basales con los niveles de varios biomarcadores a la vez, se están probando varias hipótesis al mismo tiempo, y se corre el riesgo de rechazar hipótesis nulas que son verdaderas, dando lugar a falsos positivos. Dado el gran número de comparaciones realizadas a un tiempo, la probabilidad de obtener comparaciones estadísticamente significativas aumenta. La metodología de pruebas *false discovery rate* (FDR) es una alternativa para limitar el número de falsos positivos. Al aplicar la prueba FDR a cada test de comparación, se obtiene el resultado del producto del número de comparaciones y el resultado de cada test individual.

4.3.2 Regresión logística:

El papel de un biomarcador en la predicción de un evento se analiza mediante estadísticos multivariantes: regresión logística, cuando la variable resultado es dicotómica (ausencia/presencia de lesión); regresión lineal, cuando la variable resultado es continua (volumen de LSB); y regresión ordinal, cuando la variable

resultado es categórica, con más de dos categorías y conlleva un orden (escala EPVC).

Como resultado, las regresiones nos dan la probabilidad de que ocurra el evento, en función de otros factores, como son las variables clínicas (por ejemplo: edad o valor de presión arterial) o un biomarcador, de una forma clínicamente interpretable.

Las variables que forman parte del modelo de regresión logística, se asocian de forma independiente al evento y aportan valor en función de cociente de probabilidad u *odds ratio* (OR), esto es, la capacidad de identificar verdaderos y falsos positivos. Se obtiene una fórmula de predicción en la que cada covariable es ponderada en función de su OR, y la OR del biomarcador estará ajustada por la presencia de los otros factores independientes. Las covariables que componen el modelo de regresión junto con el biomarcador, idealmente han de ser factores de riesgo asociados con el evento analizado.

Las variables de interacción o modificadoras de efecto son aquellas cuyos valores cambian la intensidad o el sentido de la relación entre el factor de estudio (biomarcador en nuestro caso) y la variable dependiente (variable resultado). Un análisis estratificado de la muestra puede servir para detectar una interacción por una tercera variable (variable modificadora de efecto) en la relación de dos variables (biomarcador y variable resultado).

4.3.3. Áreas bajo la curva característica operativa del receptor (AUC-ROC)

Las curvas ROC (del inglés *receiver operator curve*) permiten estudiar de forma sencilla la probabilidad resultante del modelo predictivo, en cuanto a la discriminación entre categorías. Por ejemplo, dados dos individuos, uno que va a presentar un ICS y otro que no, el modelo predictivo, debería asignarle una probabilidad mayor al individuo que presentará la lesión.

La representación gráfica de la curva en los ejes de sensibilidad *versus* la tasa de falsos positivos (1- especificidad), permite la medición del área bajo la curva (AUC del inglés *area under the curve*), que nos indica la precisión del modelo predictivo (DeLong, DeLong et al. 1988). El modelo predictivo que genere una AUC lo más cercana a 1, será el modelo elegido (valores entre 0,5 (discriminación dada por el azar) y 1(discriminación perfecta)).

La comparación de AUC de un mismo modelo conteniendo el biomarcador o biomarcadores añadidos nos muestra el valor añadido de los mismos. No obstante, el incremento en el valor de AUC no es tan significativo como el valor de AUC por sí mismo.

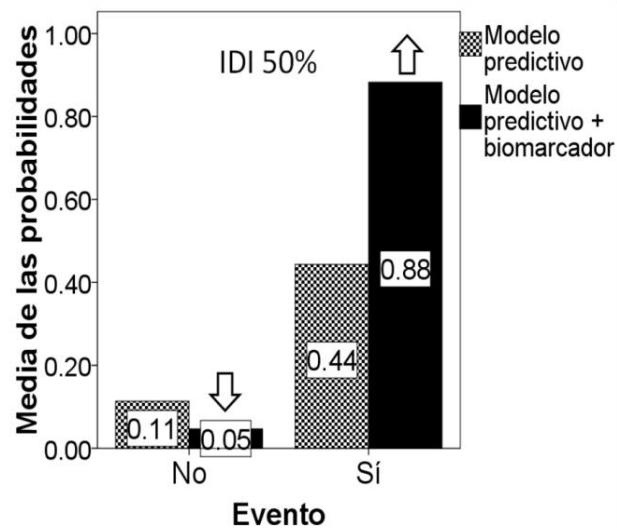
4.3.4 Índice de mejoría de la discriminación (IDI):

Para cuantificar las diferencias entre las probabilidades determinadas por el modelo predictivo entre los eventos y no eventos, al añadir el biomarcador, podemos hacer uso del Índice de mejoría de la discriminación o IDI (del inglés *improvement discrimination index*). Mientras que el AUC sólo nos indica el modelo que muestra una mayor discriminación, con el IDI obtenemos una cuantificación numérica de ésta mejoría. Se trata de una medida global de la capacidad discriminativa del modelo, la mejoría en la predicción de eventos (sensibilidad) y de no-eventos (especificidad) (Pencina, D'Agostino et al. 2008). La **figura 7** muestra una representación gráfica del IDI de un modelo predictivo.

4.3.5 Test de la razón de verosimilitud (Likelihood ratio test)

Finalmente, la mejora de la predicción de un modelo clínico al que se le añade un biomarcador puede medirse mediante el test de la razón de verosimilitud o *likelihood ratio test*. Se trata del logaritmo neperiano del cociente entre las verosimilitudes de los dos modelos. Se compara la probabilidad del modelo clínico con la probabilidad del modelo clínico con el biomarcador. Si se obtiene un p-valor significativo, querrá decir que el modelo clínico es distinto al modelo con el biomarcador.

Figura 7. Representación gráfica del estadístico comparativo del índice de mejora de la discriminación.



Resultados 5

5.1 Revisión de la literatura acerca del papel de los biomarcadores en la enfermedad cerebrovascular silente:

En este apartado se resumen los aspectos más importantes, extraídos tras realizar la revisión de la literatura. Una descripción más detallada, puede encontrarse en el apartado I de los Anexos.

Asociaciones más destacables:

Los ICS y las LSB, son las lesiones más estudiadas en relación a los biomarcadores, en la **tabla 1** se recogen aquellos marcadores que se han investigado en un mayor número de pacientes, junto con la asociación correspondiente. Cabe destacar el hecho de que, en algunos casos, las asociaciones no son consistentes (IL-6, CRP, HCY); en otros, no se han replicado los resultados en poblaciones independientes (ADMA, P-selectin, VCAM); y en otros, el tamaño muestral es muy pequeño, como por ejemplo, el factor de Von-Willebrand (Gottesman, Cummiskey et al. 2009), (Kario, Matsuo et al. 2001), (Kearney-Schwartz, Rossignol et al. 2009), la acroleína (Yoshida, Higashi et al. 2010), (Yoshida, Tomitori et al. 2009), o la neopterinina (Rouhl RP 2012) (datos no incluidos en la tabla).

En la literatura se encuentra todavía un número muy reducido de publicaciones que aborden la relación de los biomarcadores con los EPVD o con los microsangrados.

Respecto a los EPVD, se han identificado de forma preliminar tanto marcadores de inflamación (Aribisala, Wiseman et al. 2014), (Rouhl RP 2012), como de daño endotelial (Sun, Huang et al. 2014). La disfunción de las arterias perforantes podría ser la causa de la dilatación en los espacios que rodean las mismas.

Para los microsangrados, se han identificado biomarcadores asociados de inflamación (Shoamanesh, Preis et al. 2015), e incluso de daño renal como el ratio albúmina creatinina y cistatina C (Akoudad, Sedaghat et al. 2015), (Zhang, Liu et al. 2015).

En el pasado no ha existido un consenso en la definición de las lesiones, y los estudios son tan diversos que es complicado compararlos entre sí, o realizar meta-análisis de los resultados.

No obstante se está haciendo un esfuerzo por homogeneizar la terminología, como se comentó en el apartado 1.2.3, y además se está popularizando el uso de paneles de biomarcadores que permiten testar varios biomarcadores a la vez en una misma muestra de pacientes.

Con la información disponible sobre biomarcadores de enfermedad cerebrovascular silente, se pone de manifiesto el papel de diferentes procesos y vías interrelacionadas que incluyen la neuroinflamación, hemostasia y disfunción endotelial. La creación de mapas de redes funcionales con biomarcadores conocidos, mediante herramientas disponibles en la red, puede contribuir al descubrimiento de nuevos candidatos potenciales y dianas terapéuticas. En la **figura 8** se muestra un ejemplo de dichas redes funcionales construido con la herramienta STRING (<http://string-db.org/>) que incorpora los principales marcadores descritos hasta la fecha de la revisión y los candidatos predichos por la herramienta, dada su relación con los primeros.

Tabla 1.. Resumen de los biomarcadores más estudiados en el contexto de enfermedad cerebrovascular silente

Nombre del biomarcador	Código de referencia	N*	Infarto cerebral silente		Lesiones de la sustancia blanca	
			Estudios que identificaron asociación**	Estudios que no identificaron asociación	Estudios que identificaron asociación	Estudios que no identificaron asociación
CRP	P02741	9,899	(Hoshi, Kitagawa et al. 2005), (Yoshida, Tomitori et al. 2009), (Yoshida, Higashi et al. 2010), (Ishikawa, Tamura et al. 2007), (Anan, Shimomura et al. 2008),	(Satizabal, Zhu et al. 2012), (Kawamura, Umemura et al. 2006), (Pikula, Beiser et al. 2012), (Gottesman, Cummiskey et al. 2009), (Minoguchi, Yokoe et al. 2007)	(Raz, Yang et al. 2012), (Satizabal, Zhu et al. 2012), (Fornage, Chiang et al. 2008), (van Dijk, Prins et al. 2005)	(Wright, Moon et al. 2009), (Nagai, Kozaki et al. 2011), (Rouhl RP 2012), (Aribisala, Wiseman et al. 2014), (Pikula, Beiser et al. 2012)
IL6	P05231	5,803	(Bjerke, Andreasson et al. 2009), (Miwa, Tanaka et al. 2013), (Yoshida, Tomitori et al. 2009), (Yoshida, Higashi et al. 2010), (Satizabal, Zhu et al. 2012), (Ishikawa, Tamura et al. 2007)	(Fornage, Chiang et al. 2008), (Marsland, Gianaros et al. 2008)	(Fornage, Chiang et al. 2008), (Nagai, Kozaki et al. 2011)	(Aribisala, Wiseman et al. 2014), (Marsland, Gianaros et al. 2008)
HCY	CID91552	5,399	(Seshadri, Wolf et al. 2008), (Minoguchi, Yokoe et al. 2007), (Oncel, Demir et al. 2009), (Kawamura, Umemura et al. 1998), (Park, An et al. 2013)	(Pikula, Beiser et al. 2012)	(Raz, Yang et al. 2012), (Kloppenborg, Geerlings et al. 2014), (Khan, Hassan et al. 2007), (Pavlovic, Pekmezovic et al. 2011), (Oncel, Demir et al. 2009), (Park, An et al. 2013)	(Seshadri, Wolf et al. 2008), (Pikula, Beiser et al. 2012)
UACR	ALBU:P02768, Creatinine:CID 588	4,803	(Wada, Nagasawa et al. 2007), (Delgado, Riba-Llena et al. 2014), (Vermeer, van Dijk et al. 2002)	(Pikula, Beiser et al. 2012)	(Wada, Nagasawa et al. 2007), (Knopman, Mosley et al. 2008)	(Pikula, Beiser et al. 2012)

			Infarto cerebral silente		Lesiones de la sustancia blanca	
Nombre del biomarcador	Código de referencia	N*	Estudios que identificaron asociación**	Estudios que no identificaron asociación	Estudios que identificaron asociación	Estudios que no identificaron asociación
ADMA	CID123831	3,272	(Pikula, Boger et al. 2009)		(Khan, Hassan et al. 2007)	
Amyloid beta (1-40)	CID57339250	3,012	(Gomis, Sobrino et al. 2009), (van Dijk, Prins et al. 2004)		(Gomis, Sobrino et al. 2009), (van Dijk, Prins et al. 2004)	
Amyloid beta (1-42)	CID57339251	1,839		(Gomis, Sobrino et al. 2009)		
ICAM1	P05362	963	(Sarchielli, Nardi et al. 2013), (Kawamura, Umemura et al. 2006), (Matsui, Arai et al. 2001)		(Rouhl RP 2012), (Han, Wong et al. 2009), (Markus, Hunt et al. 2005)	(Hassan, Hunt et al. 2003)
E-Selectin	P16581	721		(Rouhl RP 2012), (Kawamura, Umemura et al. 2006), (Matsui, Arai et al. 2001)	(Fassbender, Bertsch et al. 1999)	(Rouhl RP 2012)
VCAM1	P19320	495	(Rouhl RP 2012)	(Kawamura, Umemura et al. 2006)	(Rouhl RP 2012), (de Leeuw, de Kleine et al. 2002)	
P-Selectin	P16109	440	(Ravera, Ratto et al. 2002)	(Rouhl RP 2012)	(de Leeuw, de Kleine et al. 2002)	(Rouhl RP 2012)

Los nombres y los códigos de referencia fueron extraídos de las bases de datos *Uniprot*, *PubChem* and *RCSB*. Los nombres completos son: interleucina-6 (IL-6), Proteína reactiva C(CRP), Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM1), Molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM1), Selectina-E (LYAM2), Selectina-P (LYAM3), Homocisteína (HCY), Dimetilarginina asimétrica (ADMA), Péptido beta-amiloide (1-40) (*Amyloid beta (1-40)*), Péptido beta-amiloide (1-42) (*Amyloid beta (1-42)*), Ratio albúmina creatinina (UACR). * N es el tamaño muestral total que es la suma de los pacientes incluidos en los estudios correspondientes a cada biomarcador. ** Casi todas las asociaciones de los biomarcadores con ICS y LSB son positivas (+), esto es, los niveles elevados del biomarcador se asociaron con una prevalencia elevada, con el número o con la progresión, excepto algunos estudios, en los cuales se encontraron asociaciones negativas (-), indicando un efecto protector (los niveles elevados del biomarcador se asociaron con baja prevalencia, o con número o progresión disminuidos).

Figura 8. Relaciones funcionales de los biomarcadores más estudiados en relación a enfermedad cerebrovascular silente y los biomarcadores predichos más probablemente asociados a éstos.

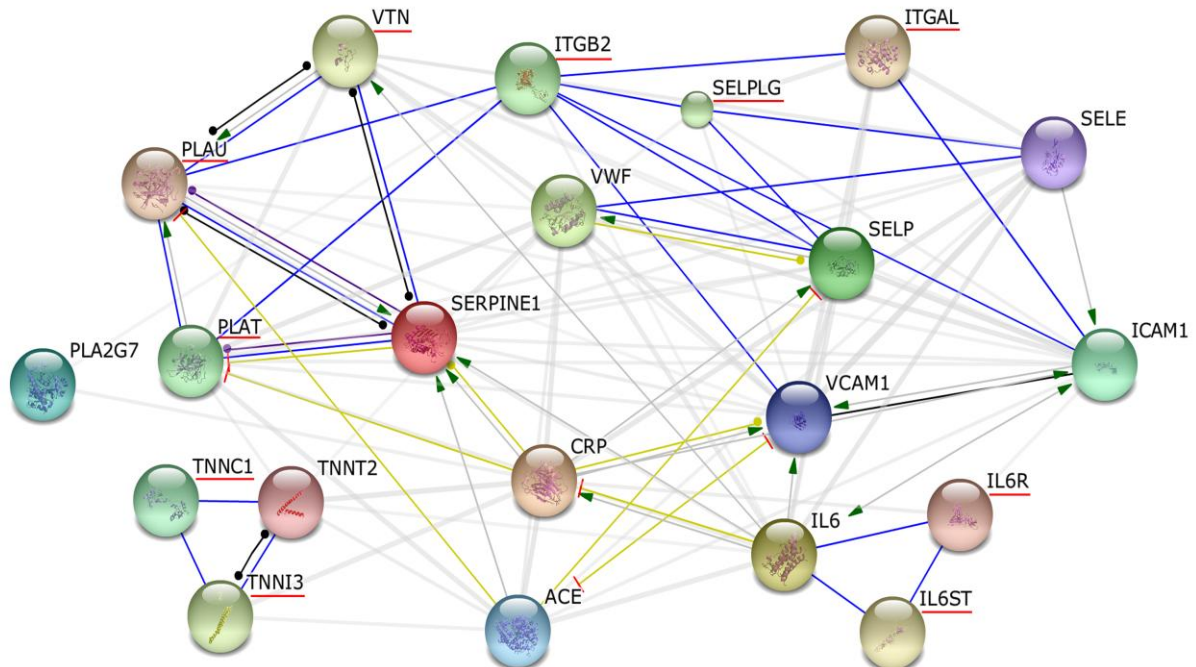


Gráfico de red que representa la aplicación del método de predicción *text mining* en el conjunto de biomarcadores revisados, que mostraron una asociación consistente con ICS y LSB, y los correspondientes biomarcadores predichos. Las líneas de colores representan diferentes conexiones basadas en la evidencia, los datos se han extraído de bases de datos como *Saccharomyces Genome Database (SGD)*, *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*, *FlyBase*, y *PubMed*. Cabeza de flecha verde: activación; líneas perpendiculares rojas: inhibición; líneas verdes: co-expresión; líneas azules: unión; líneas grises: co-ocurrencia de genes significativa; subrayado rojo: biomarcador predicho. Las proteínas correspondientes a los nombres de los genes mostrados son: Troponina t (TNNT2), Molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM1), Selectina-E (SELE), Interleucina-6 (IL-6), Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (PLA2G7), Proteína reactiva C (CRP), Molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM1), Enzima convertidora de angiotensina (ACE), Factor de Von Willebrand (VWF), Inhibidor 1 del activador de plasminógeno (SERPINE1), Selectina-P (SELP). Las proteínas correspondientes a los biomarcadores predichos son: Activador del plasminógeno Urocinasa (PLAU), Vitronectina (VTN), Activador del plasminógeno de tejido (PLAT), ligando de la Selectina-P (SELPLG), integrina beta 2 (ITGB2), integrina alpha L (ITGAL), trasductor de la señal de interleucina-6 (IL6ST), receptor de interleucina-6 (IL-6R), troponina 1 tipo 3 (TNNI3), and troponina C de tipo 1 (TNNC1) *STRING database* (<http://string-db.org/>).

5.2. Estudio de los biomarcadores relacionados con la presencia de infartos cerebrales silentes.

La prevalencia de ICS en la cohorte completa del estudio ISSYS fue del 10,1%. Los factores asociados a la presencia de ICS fueron descritos en un trabajo previo del grupo (Delgado, Riba-Llena et al. 2014). Como se observa en la **tabla 2**, los pacientes más mayores, de sexo masculino, con niveles más bajos de colesterol HDL, valores de PAD más elevados, y en general, con mayor riesgo vascular global, mostraron más ICS. También, como se comentará más adelante, la presencia de microalbuminuria se asoció de forma independiente a la edad y los principales factores de riesgo vascular con la presencia de infartos silentes.

Tabla 2. Características basales de la muestra completa y análisis univariante de los ICS.

	Características basales (n=976)	Ausencia de ICS(n=877)	de Presencia de ICS (n=99)
Edad, años	64(60-67)	64(59,5-67)	65(61,7-69) **
Sexo, mujeres	50,6%	53,1%	28,3% **
Tabaquismo	15,2%	15,3%	14,1%
Abuso de alcohol	6,4%	6,7%	4,8%
Diabetes mellitus	23,5%	22,7%	30,3%
Colesterol HDL	47,5(40,1-57)	47,9(40,3-57,4) **	44,9(39-53)
Colesterol total	218(188-244)	218(189-244)	212,5(181-241)
Obesidad abdominal	72,7%	72,7%	72,4%
REGICOR	6(4-9)	6(4-8)	7(5-10,8)**
Media PAS(mm Hg)	141,5(132-153)	141,5(132-153)	144(130-155,6)
Media PAD(mm Hg)	77,5(71-84)	77(70,5-84)	81,5(72,8-89,7) **
Enfermedad vascular establecida	12,3%	11,2%	22,2% **
Enfermedad coronaria	6,7%	8,7%	18,6% **
Microalbuminuria	12,9%	11,5%	26,4% **

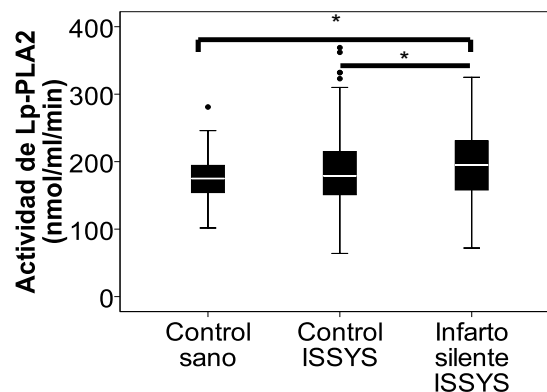
Datos expresados como mediana (rango intercuartílico), media±desviación típica y porcentajes según proceda. PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; HDL: lipoproteínas de alta densidad (del inglés high density lipoproteins) ICS: infarto cerebral silente. **p-valor<0,01.

5.2.1 Actividad Lp-PLA2:

En éste análisis se incluyeron 921 pacientes, de los cuales 57,7% fueron mujeres y con una media de edad de 64 años. Se descartaron 51 muestras no válidas por un exceso de turbidez o por hemólisis de la muestra. (Anexo II)

Se obtuvieron medidas de actividad de Lp-PLA2 de 49 pacientes sanos, como grupo de referencia o control, sin factores de riesgo ni enfermedades vasculares. En la **figura 9** se puede observar que los niveles de Lp-PLA2 correspondientes a los pacientes sanos sin factores de riesgo y a los pacientes del estudio, sin ICS, no fueron significativamente diferentes (MW p-valor= 0,249).

Figura 9. Representación gráfica de los niveles de actividad de Lp-PLA2 en los grupos de pacientes analizados.



* p-valor <0.01.

En la **Tabla 4** se describen los factores asociados con los niveles de actividad de Lp-PLA2. La actividad de LpPLA2 fue diferente según el sexo (**Figura 10 A**), los hombres mostraron mayor actividad de la enzima que las mujeres; y según la presencia de varios factores de riesgo vascular como la diabetes o el tabaquismo. Como era de esperar, encontramos que la presencia de dislipidemia y el tratamiento con estatinas, también afectaron a los niveles de actividad (todos con p-valor <0,05).

La actividad de LpPLA2 se asoció con la presencia de ICS (p-valor=0,037) (**Figura 10 panel B**).

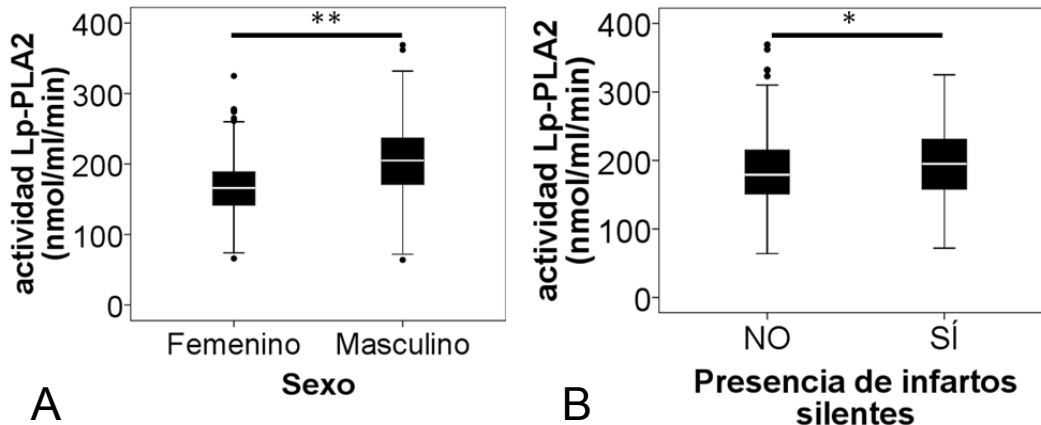
Tabla 3. Variables asociadas con la actividad de Lp-PLA2.

Características	Actividad Lp-PLA2 (nmol/ml/min)
Edad	
• ≤64	183(153-219)
• >64	179(151-212)
Sexo	
• Mujer	165,5(142-183)
• Hombre	204(168-233) **
Tabaquismo	
• No	183(155-217)
• Si	195(165-233)**
Diabetes Mellitus	
• No	186(156-225)
• Si	177(156-213)**
Dislipidemia	
• No	195(169-229)
• Si	179(155-218) *
Colesterol Total (mg/dl)	
• ≤216	172(143-208)
• >216	189(164-222)**
Enfermedad vascular establecida	
• No	183(154-217)
• Si	170(141-201) **
REGICOR **	
• Riesgo bajo	163,5(140-189)
• Riesgo moderado	188(163-222)
• Riesgo alto	195(161-232)
• Riesgo muy alto	179(148-220)
Estatinas	
• No	197(168-232)
• Si	172(144-203) **

Los datos están expresados como porcentajes y medianas (rango intercuartílico);

* p-valor<0.05, **p-valor<0.01.

Figura 10. Representación gráfica de la relación de la actividad de Lp-PLA2 con los ICS y con el sexo.



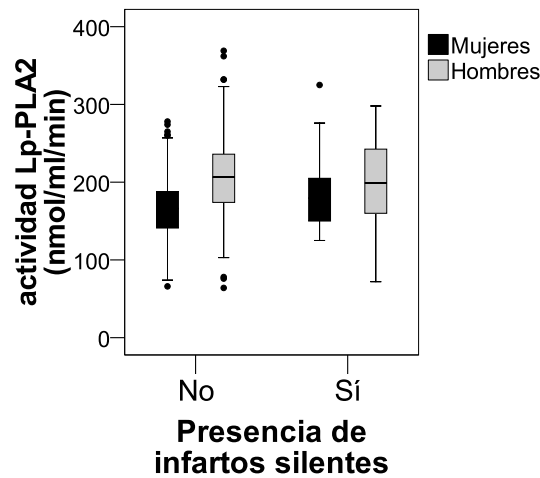
* p-valor<0.05, **p-valor<0.01.

En la muestra analizada, 93 pacientes (10,1%) mostraron uno o más ICS (66,7% con una lesión; 19,3% con dos, y 14% con tres o más lesiones).

El análisis univariante de los ICS para ésta muestra, mostró que los pacientes de sexo masculino, de mayor edad, con dislipidemia, y con valores de presión arterial diastólica mayores, mostraban más ICS (todos con p-valor<0,05). Aquellos pacientes que tenían enfermedad vascular establecida (12,5%) mostraban más ICS que aquellos que nunca habían tenido un evento (22,6% vs 11,4%, p-valor=0,002). En la **figura 11** se observan las diferencias dadas por el sexo, en la relación de la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS. En la figura se aprecia además que los pacientes de sexo femenino que presentaron ICS mostraban valores más bajos de Lp-PLA2 que los pacientes de sexo masculino que no presentaron ICS

Como se observa en la **tabla 4**, la actividad de Lp-PLA2 no se asoció de forma independiente con la presencia de ICS considerando toda la muestra. Sin embargo, dadas las diferencias entre mujeres y hombres, se decidió introducir la variable sexo como modificadora del efecto y testar la interacción entre sexo y actividad de Lp-PLA2 en la asociación de la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS.

Figura 11. Representación gráfica de las diferencias entre sexos en la relación de la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS.



Después de ajustar el modelo por confusores como la edad, el sexo, la diabetes, el tabaquismo, el tratamiento con estatinas, el colesterol total, la presencia de enfermedad vascular establecida y la variable interacción entre la actividad de LpPLA2 y el sexo, el biomarcador se mantuvo como predictor independiente de la presencia de ICS en mujeres (OR por incremento en una desviación estándar =2,14, intervalo de confianza 95%, 1,31 a 3,50), pero no en los hombres (OR por incremento en una desviación estándar =1,09, intervalo de confianza 95%, 0,81 a 1,48).

Tabla 4. Análisis multivariante para la asociación de la actividad Lp-PLA2 con la presencia de IS

Sexo	n ICS	OR (IC 95%) per DS	p-valor	p- interacción
Ambos (n=921)	93	1.29 (0,98-1,69)	0,067	-
Hombres (n=445)	67	1,09 (0,81-1,48)	0,55	0,017
Mujeres (n=476)	26	2,14 (1,31-3,50)	0,002	

n ICS: número de pacientes con ICS, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza, DS: desviación estándar (46.9 nmol/mL/min). En el modelo se incluyeron las variables edad, DM, tabaquismo, tratamiento con estatinas, colesterol total, enfermedad vascular establecida y la variable interacción entre la actividad de LpPLA2 y el sexo.

Dados los resultados obtenidos, y con el objetivo de encontrar un punto de corte más útil desde el punto de vista clínico, se evaluó la presencia de un efecto de umbral en la relación entre la actividad de LpPLA2 y los ICS en las mujeres. Para ello, se calcularon los cuartiles de la variable del biomarcador, y se encontró que las mujeres que se hallaban en el cuartil más alto (situado en 189 nmol/mL/min), tenían 3 veces más riesgo de presentar un ICS que aquellas con niveles de actividad en los cuartiles restantes (OR per DS=3,4, IC 95% 1,38 to 8,41, p-valor=0,008).

5.2.2. Patrones de N-glicosilación sérica:

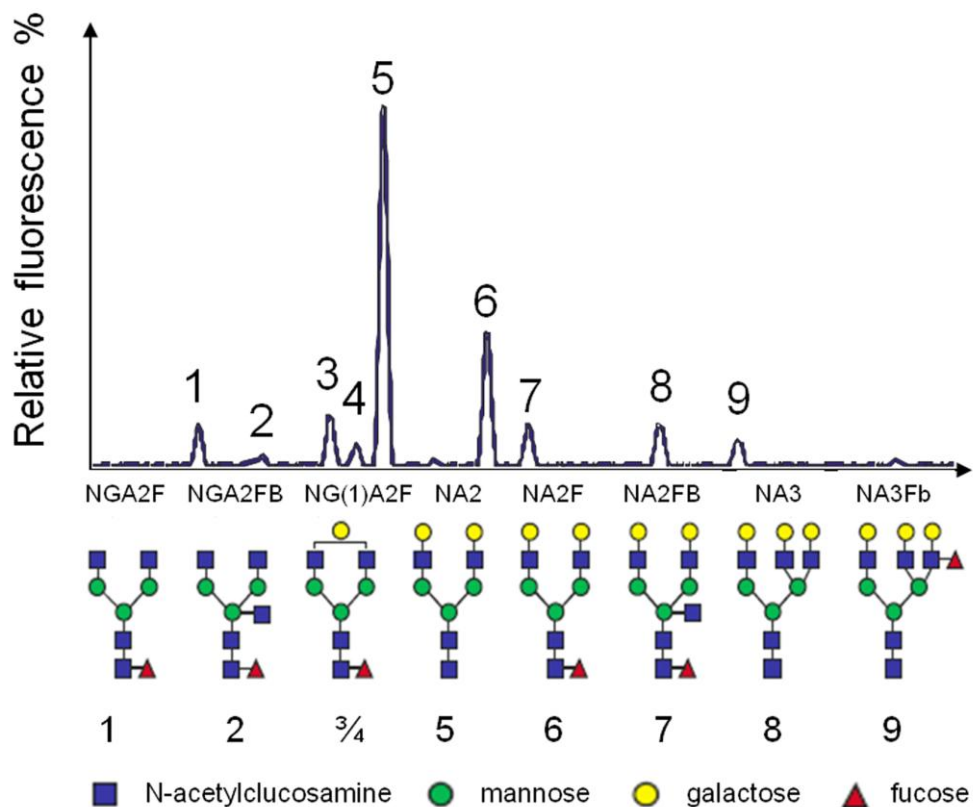
El perfil de glicosilación se obtuvo en 972 pacientes de toda la cohorte de estudio, puesto que cuatro muestras no pudieron ser analizadas. La edad media fue de 64 años y el 50,5% fueron mujeres, las demás características fueron muy similares a las de la cohorte completa, mostradas en la **tabla 2**. De cada muestra se obtuvo un perfil compuesto por 9 picos que corresponden a la concentración relativa de los oligosacaridos más prominentes en suero humano.

Los picos identificados en las muestras corresponden a las siguientes estructuras: pico 1, *agalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan (NGA2F)*; pico 2, *agalacto core- α -1,6-fucosylated bisecting biantennary glycan (NGA2FB)*; picos 3 y 4 *monogalactosylated core- α -1,6-fucosylated biantennary glycans (NG1A2F)*; pico 5, *bigalacto biantennary glycan (NA2)*; pico 6, *bigalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan (NA2F)*; pico 7, *bigalacto core- α -1,6-fucosylated bisecting biantennary glycan (NA2FB)*; pico 8, *triantennary glycan (NA3)*; y pico 9, *branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan (NA3Fb)*. Todos los n-glicanos siguieron una distribución no normal excepto el pico 5.

En la **figura 12** se muestra la representación gráfica de las estructuras correspondientes a los N-glicanos identificados, y fórmulas estructurales de los mismos.

En cuanto a los factores relacionados con los N-glicanos encontramos lo siguiente: la edad mostró una correlación positiva con NGA2F y NGA2FB ($R=0,14$, $p\text{-valor}<0,001$ and $R=0,17$, $p\text{-valor}<0,001$ respectivamente), mientras que con NA2F y NA3, la correlación fue negativa ($R=-0,12$, $p\text{-valor}<0,001$ y $R=-0,06$, $p\text{-valor}=0,051$ respectivamente). Se analizó también si la transformación logarítmica del ratio de NGA2F y NA2F (o GlycoAgeTest) correlacionaba con la edad, y los resultados fueron los esperables ($R=0,17$, $p\text{-valor}<0,001$), es decir, la relación entre ambos picos se asoció de forma positiva a la edad en nuestro estudio, tal y como ya se había descrito previamente (Vanhooren, Dewaele et al. 2010).

Figura 12. Representación gráfica del perfil sérico de los N-glicanos.



En la **tabla 5** se muestran las asociaciones de los diferentes N-glicanos con los factores demográficos y de riesgo clásicos.

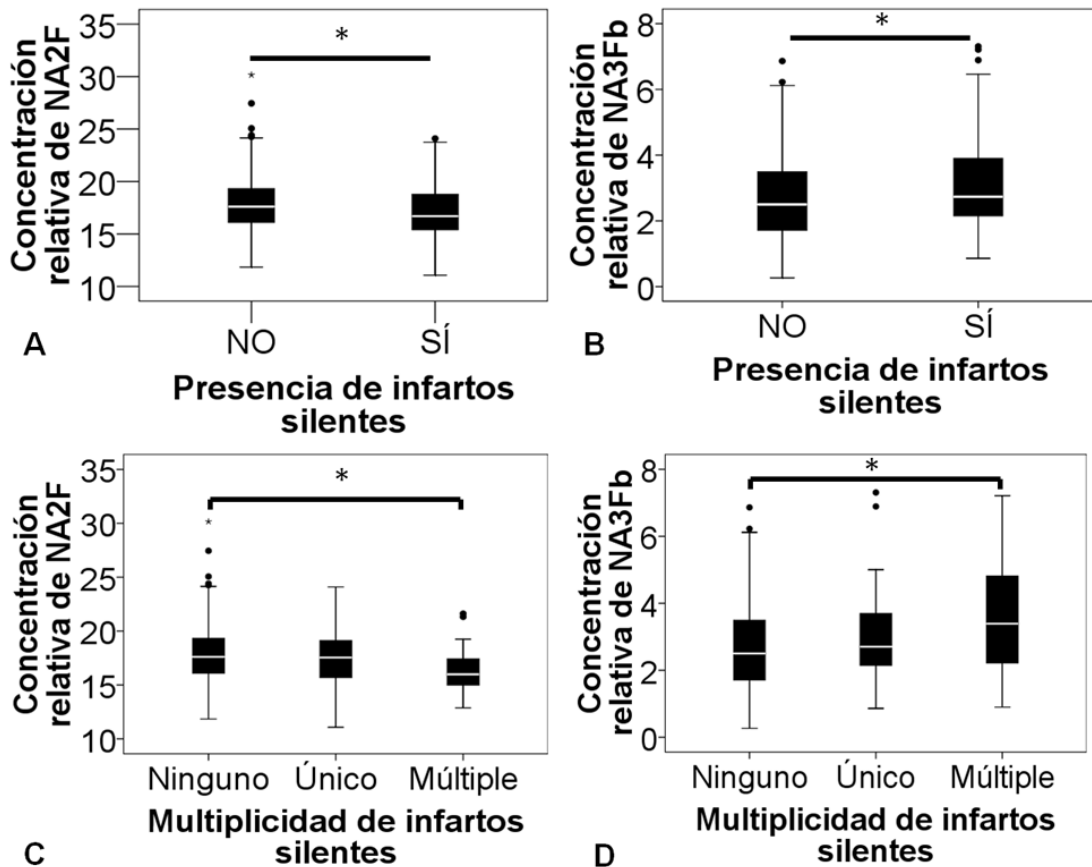
Tabla 5. Relaciones entre los factores de riesgo vascular y las concentraciones relativas de los N-glicanos detectados en suero.

Características	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9
Edad (años)	R=0,145 p<0,001‡	R=0,168 p<0,001‡	R=-0,020 p=0,527	R=-0,035 p=0,273	R=0,001 p=0,695	R=-0,122 p<0,001 ‡	R=-0,032 p=0,316	R=-0,059 p=0,069	R=-0,019 p=0,563
Sexo									
- Mujeres	9,7(7,8-11,8) ** ‡	1,8(1,5-2,3) ** ‡	6(5,2-7)	4,6(4-5,2) 4,8(4,1-5,4)	41,5+/-4,3	17,1(15,7-18,6) 17,9(16,5-19,7)	6(5,2-7)	8(6,3-9,3) **‡	2,1 (1,4-2,9) 2,9(2,1-4)
- Hombres	9,1(7,4-11,5)	1,7(1,4-2,2)	6,1(5,2-7)	**‡	41,7+/-4,5	**‡	6,2(5,3-7,2)	6,6(5,4-8)	**‡
DM									
- No	9,5(7,7-1,2)	1,8(1,4-2,2)	6,4(5,3-7) **‡	4,7(4,1-5,4) **‡	41,5+/-4,3	17,5(16-19,2)	6,1(5,3-7,1)	7,2(5,9-8,8)	2,6(1,7-3,6)**
- Sí	9,5(7,7-1,2)	2(1,5-2,4) ** ‡	5,5(4,9-6,5)	4,4(3,9-5,1)	41,8 +/-4,7	18(16-19,2)	6,2(5,3-7,3)	7,6(6,3-9)	2,3(1,7-3,2)
HDL	R=0,021 p=0,516	R=-0,017 p=0,603	R=0,046 p=0,185	R=-0,031 p=0,343	R=0,017 p=0,589	R=-0,044 p=0,171	R=0,036 p=0,259	R=0,106 p<0,001 ‡	R=-0,167 p<0,001 ‡
Tabaquismo									
- No	9,7(7,8-11,7) ** ‡	1,8(1,5-2,3)	6, 1(5,2-7)** ‡	4,7(4,1-5,4) **‡	41,2+/-4,3	17,6(16,2-19,3) ** ‡	6(5,2-7) 6,4(5,5-7,3)	7,3(6,1-8,9)	2,3(1,6-3,3) 3,5(2,6-4,7)
- Sí	8,3(6,8-10,5)	1,8(1,5-2,3)	4,8(5,5-6,3)	4,2(3,8-4,8)	43,4+/-4,4** ‡	16,5(15,2-18)	** ‡	7,1(6,4-8,5)	** ‡
Abuso de alcohol									
- No	9,2(7,6-1,1)	1,8(1,5-2,3)	6(5,2-6,9)	4,8(4,1-5,4)	41,7+/-4,4	17,5(16-19,2)	6,3(5,3-7,2)	7(5,8-8,5)	2,7(1,9-3,6)
- Sí	9(7,3-1,1)	1,8(1,5-2,1)	5,5(5-6,6)	4,5(4-4,9)	42+/-4,2	17,7(16-19,5)	6,3(5,8-7,2)	7,9(6,4-9,3)	3,4(2,5-4,1)**
IMC, Kg/m2	R=0,124 p<0,001‡	R=0,112 p<0,001‡	R=-0,069 p=0,035	R=-0,008 p=0,802	R=-0,057 p=0,078	R=-0,068 p=0,037	R=-0,023 p=0,480	R=0,069 p=0,034	R=-0,022 p=0,492
Enfermedad coronaria									
- No	9,5(7,7-11,6)	1,8(1,5-2,3)	6(5,2-7)	4,7(4,1-5,4)	41,6+/-4,3	17,5(16-19,3)	6,1(5,2-7,1)	7,3(6-8,9)	2,6(1,7-3,6)
- Sí	9,2(7,7-11,4)	1,8(1,5-2,2)	6,2(5,2-6,9)	4,7(4,1-5,4)	41,5+/-5	17,9(16,6-19,5)	6,2(5,3-7,5)	7,1(5,7-8,5)	2,4(1,7-3,3)
ECP									
- No	9,5(7,7-1,7)	1,8(1,5-2,3)	6,1(5,2-7)	4,7(4,1-5,4)	41,5+/-4,4	17,5(16-19,3)	6(5-7)	7,3(6-8,9)	2,6(1,7-3,6)
- Sí	9,17(7,7-1,1)	1,8(1,6-2,2)	5,9(5,2-6,7)	4,6(4-5,3)	42+/-4,8	17,7(16,4-19,3)	6,3(5,4-7,5)*	7,1(5,8-8,4)	2,5(1,8-3,5)

Las celdas contienen los p-valores para la asociación entre cada N-glicano y las características de la muestra, Para la edad, índice de masa corporal y el perímetro abdominal se dan los coeficientes de correlación de *Pearson* o *Spearman* según corresponda (r), IMC es el índice de masa corporal, y el perímetro abdominal se expresa en cm. ECP: Enfermedad cardiovascular previa (* p-valor<0,050; ** p-valor<0,010, ‡ asociaciones que permanecieron significativas después de aplicar la corrección del False Discovery Rate (FDR))

Al estudiar la relación entre los N-glicanos y la presencia de ICS, encontramos que NA2F (pico 6) y NA3Fb (pico 9) se asociaron de forma opuesta con la presencia (Figura 13-Paneles A y B) y con la multiplicidad de ICS (Figura 13-Paneles C y D).

Figura 13. Representación gráfica de la relación entre NA2F y NA3Fb y la presencia (Paneles A y B) y número (Paneles C y D) de ICS.



NA2F: *bigalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan*, que corresponde al pico 6; NA3Fb: *branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan*, que corresponde al pico 9. * $p < 0.01$.

Los resultados del análisis multivariante se muestran en la **tabla 6**. Para evaluar el papel independiente de los N-glicanos en la relación con los ICS, se calcularon los puntos de corte adecuados según los valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de ICS (NA2F $\leq 16,66$: sensibilidad = 50%, especificidad = 67% y NA3Fb $\geq 2,11$: sensibilidad = 79,6%, especificidad = 38,6%).

En éste análisis, se introdujeron los biomarcadores actividad de Lp-PLA2 y la microalbuminuria, cuya asociación con la presencia de ICS había sido descrita por nuestro grupo (Delgado, Riba-Llena et al. 2014), (Riba-Llena, Penalba et al. 2014), con el objetivo de determinar si los N-glicanos podrían aportar una mejora en la predicción respecto a lo que ya conocíamos.

Tanto NA2F, como NA3Fb, se asociaron de manera independiente con la presencia de ICS en los modelos ajustados de forma completa. Otros predictores independientes fueron el incremento de la edad, el sexo masculino, el incremento de PAD y la presencia de microalbuminuria.

Tabla 6. Análisis multivariante para la asociación de los picos de glicosilación con la presencia de IS.

Variables	OR (95% IC)		
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Edad por incremento de 1 año	1.09 (1.05-1.14)	1.08 (1.03-1.13)	1.08 (1.03-1.13)
Sexo, hombres	2.84 (1.77-4.57)	2.61 (1.58-4.32)	2.5(1.46-4.28)
Media de PAD por incremento de 1 mmHg	1,03 (1,00-1,05)	ns	1,3(1,00-1,05)
Microalbuminuria	-	2,50 (1,45-4,,31)	1,87(1,04-3,36)
NA2F≥16,657	-	-	0,42 (0,26--0,69)
NA3Fb>2,1134	-	-	1,81(1,00-3.28)

El modelo 1 se ajustó por edad, sexo, media de la presión arterial diastólica (PAD), diabetes mellitus, tabaquismo, y colesterol HDL. El modelo 2 se ajustó de forma adicional por microalbuminuria y actividad de Lp-PLA2 (nmol/ml/min). El modelo 3 contiene las covariables del modelo 2 y adicionalmente los picos NA2F y NA3Fb expresados tomando como referencia un punto de corte.

Ns: la media de PAD no se mostró asociado en el modelo 2.

5.2.3 NT-proBNP:

Se obtuvieron las concentraciones de NT-proBNP en 278 pacientes seleccionados por la presencia de lesiones en la RM. Las características de esta muestra del estudio son similares a las de los pacientes que no se incluyeron en el análisis, respecto a la edad (p-valor=0,79), PAD (p-valor=0,54), PAS (p-valor=0,59). La diferencia más importante fue que en el grupo en que se determinó NT-proBNP había una mayor proporción de hombres (p-valor<0,001). Los niveles de NT-proBNP no siguieron una distribución normal en nuestra muestra, por lo que se aplicó una transformación logarítmica para obtener dicha distribución normal. La proporción de ICS (26,3%) fue mayor en ésta muestra que en la cohorte completa, debido a la selección de pacientes.

Como se muestra en la **tabla 7**, los niveles de NT-proBNP se correlacionaron de forma positiva con la edad, con PAD y se encontraron más elevados en aquellos pacientes con enfermedad cardíaca previa y con fibrilación auricular. A diferencia de estudios previos no encontramos relación entre los niveles de NT-proBNP y el filtrado glomerular renal en nuestra muestra.

En relación a la presencia de infartos cerebrales silentes, los pacientes que presentaban ICS, mostraron niveles más elevados de NT-proBNP (p-valor<0.001).

En este análisis, la presencia de una enfermedad cardiovascular establecida, se definió excluyendo las arteriopatías periféricas y se denominó enfermedad cardíaca previa.

Para evaluar si la asociación de NT-ProBNP era independiente del efecto de otros factores de riesgo vascular o de enfermedad cardíaca previa, realizamos un análisis multivariante mediante la construcción de tres modelos de regresión logística, el modelo 1 se corrigió por las variables edad y sexo; el modelo 2, se corrigió por las variables REGICOR, y fibrilación auricular; y el modelo 3, se corrigió por las variables edad, sexo, media de la presión arterial, enfermedad cardíaca previa, y fibrilación auricular.

El NT-proBNP se mantuvo como predictor independiente de los ICS, de forma consistente en los tres modelos, incluso después de ajustar por factores de riesgo vascular, fibrilación auricular y enfermedad cardíaca previa (Modelo 3: OR por desviación típica de log NT-proBNP =1,85, intervalo de confianza 95% 1,34 a 2,55).

Tabla 7. Descripción de las características de la muestra y análisis univariante del NT-proBNP.

Características	N=278	log NT-pro-BNP (pg/ml)
Edad, años	63(59-67)	0,157 **
Sexo		
• Mujeres	115(41,4)	1,76+/-0,4
• Hombres	163(58,6)	1,79+/-0,46
Media PAD (mmHg)	78,2+/-8,9	-0,01
Media PAS (mmHg)	141,5(134-151,5)	0,128 *
Perímetro abdominal (cm)	102(65-110)	0,042
Colesterol total (mg/dL)	213,5(190-241)	- 0,25 **
Tabaquismo		
• No	234(84,2)	1,77+/-0,44
• Si	44(15,8)	1,82+/-0,43
Diabetes Mellitus		
• No	205(73,7)	1,75+/-0,41
• Si	73(26,3)	1,84+/-0,50
Enfermedad cardíaca previa		
• No	240(86,6)	1,73+/-0,40
• Sí	37 (13,4)	2,08+/-0,51 **
Fibrilación auricular		
• No	270(97,1)	1,76+/-0,42
• Sí	8(2,9)	2,43+/-0,65 **
FGE (mL/min/1.73m ²)	82,3(71,3-94,6)	-0,121
REGICOR **		
• Riesgo bajo (<5%)	52(18,9)	1,74+/-0,42
• Riesgo moderado(5-9.9%)	132(48)	1,76+/-0,42
• Riesgo alto (10-14.9%)	41(14,9)	1,68+/-0,35
• Riesgo muy alto (>15%)	50(18,2)	1,96+/-0,27 *

Los datos de las características basales están expresados como número de pacientes (porcentaje) y mediana (rango intercuartílico), para el análisis univariante de NT-proBNP, media y desviación típica, y coeficiente de Pearson. Media PAD es media de la presión arterial diastólica; media PAS es media de la presión arterial sistólica, y FGE: Filtrado glomerular estimado.* p-valor<0,05, **p-valor<0,01.

5.2.4 Valor añadido de los biomarcadores en el diagnóstico de los ICS

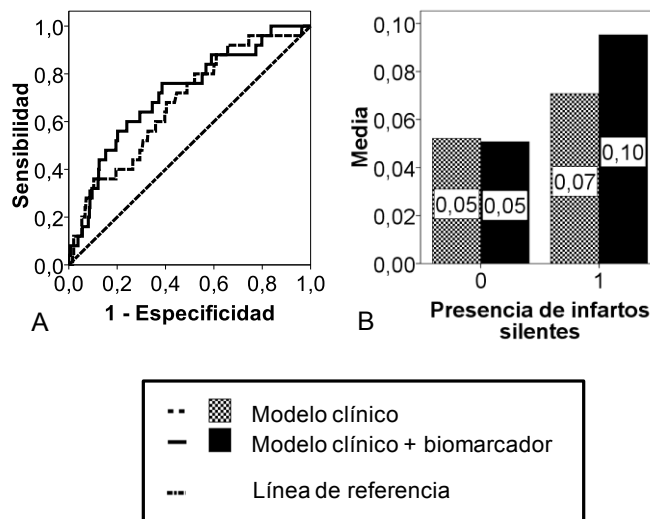
A continuación analizamos si los biomarcadores (además de ser factores de riesgo independientes) tenían algún valor añadido a las variables clínicas, y determinar su utilidad en la predicción del riesgo de infarto cerebral silente. Para ello utilizamos herramientas estadísticas tales como las curvas ROC e IDI, como se ha descrito previamente en el apartado 3.3.

5.2.4.1 Actividad de Lp-PLA2:

El modelo clínico utilizado para la predicción de ICS en mujeres, incluyó con las variables edad, DM, tabaquismo, tratamiento con estatinas, colesterol total, enfermedad vascular establecida y la variable interacción entre la actividad de LpPLA2 y el sexo. La capacidad predictiva medida con el área bajo la curva (AUC), no fue significativamente diferente (p -valor=0,40) pese a una discreta mejoría entre el modelo con (0,73) y el modelo sin el biomarcador (0,68) (**Figura 14 A**).

La discriminación del modelo con el biomarcador, fue levemente mejor que la del modelo sin biomarcador, pero no se encontraron diferencias significativas (IDI=3,1%, p -valor=0,12). (**Figura 14 B**) La mejoría de la discriminación no fue significativa..

Figura 14. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de la actividad de Lp-PLA2 con la presencia de ICS.

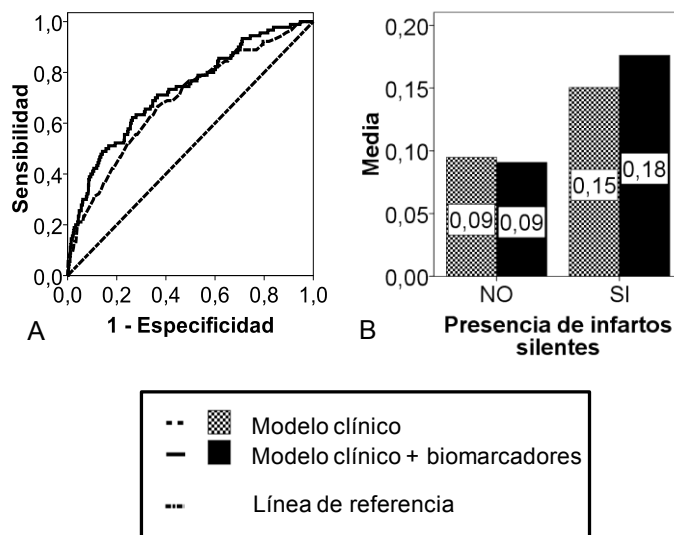


5.2.4.2 Patrones de N-glicosilación sérica:

El modelo clínico utilizado para la predicción de ICS, incluyó las variables edad, sexo, media de PAD, DM, tabaquismo, colesterol HDL, microalbuminuria y actividad de Lp-PLA2.

El test de la razón de de Verosimilitud (**Likelihood Ratio**) o *LR Test* mostró que los n-glicanos NA2F y NA3FB, mejoraron de forma significativa la predicción de ICS en el modelo de ajuste completo (Chi Square of the likelihood ratio test= 11,394, p-valor <0,001). Por otro lado, el incremento de la precisión diagnóstica medido con el área bajo la curva (AUC) no fue significativo (p-valor=0,083). **(Figura 15 A)** El valor de AUC para el modelo 2 (conteniendo microalbuminuria y actividad de Lp-PLA2) (70,3%) fue menor que el del modelo 3 (73,5%). La mejoría de la discriminación (IDI) del modelo de ajuste completo con los n-glicanos fue de 2.96% con un p-valor<0,001. **(Figura 15 B).**

Figura 15. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de NA2F con la presencia de ICS.

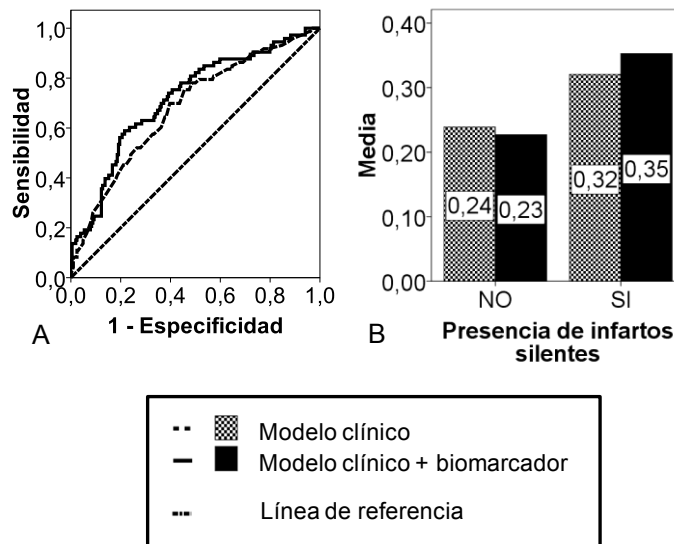


5.2.4.3 NT-proBNP

De igual forma analizamos el valor añadido del NT-proBNP en los modelos de ajuste completo (Modelo 2: REGICOR y fibrilación auricular, Modelo 3: edad, sexo, media de la presión arterial, enfermedad cardíaca previa, y fibrilación auricular)

Se encontró una tendencia en el incremento de la capacidad predictiva (AUC) de los modelos que contenían el biomarcador (modelo 2 p-valor=0,058, modelo 3 p-valor=0,091). La discriminación de los modelos con el biomarcador fue significativamente mejor en ambos casos, con valores de IDI=5,29% p-valor<0,001 para el modelo 2, e IDI=4,42% p-valor=0,004 para el modelo 3. En la **figura 16 A y B** se muestra la representación gráfica de las curvas ROC e IDI para el modelo 3, las correspondientes para el modelo 2 son muy similares.

Figura 16. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de NT-proBNP con la presencia de ICS.



5.2.5. Resumen de los hallazgos principales, y combinación de los biomarcadores.

La actividad de la Lp-PLA2 predijo un incremento de dos veces el riesgo de padecer un ICS en mujeres. No obstante el incremento de AUC y el IDI del modelo clínico con éste biomarcador no fueron significativos respecto al modelo clínico.

Los n-glicanos NA2F y NA3Fb predijeron un incremento de casi tres y dos veces respectivamente, el riesgo de padecer un ICS en ambos sexos. El incremento de AUC y el IDI del modelo clínico con éstos biomarcadores fue significativo respecto al modelo clínico. La combinación de éstos, con la microalbuminuria, y con la actividad de Lp-PLA2, dió como resultado, un incremento aún mayor de la capacidad predictiva global respecto a los datos clínicos.

Por otro lado el NT-proBNP predijo un incremento de hasta casi dos veces el riesgo de presentar un ICS, de forma independiente a la presencia de fibrilación auricular o enfermedad cardíaca previa, los principales factores de riesgo asociados al incremento de dicho biomarcador.

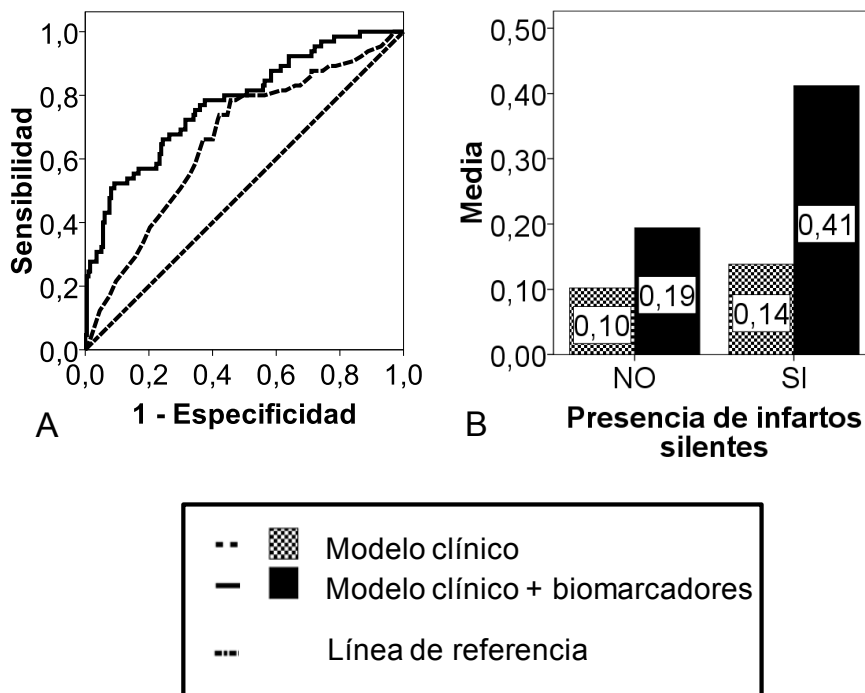
Dadas las asociaciones descritas con los ICS, decidimos combinar los biomarcadores en un modelo predictivo que englobara los factores de riesgo definidos para cada uno y para los ICS. De éste modo podríamos analizar si el incremento de la predicción aumentaba en mayor grado que analizándolos por separado.

Dada la limitación de una variable por cada diez eventos para el modelo de regresión logística, decidimos testar el modelo conteniendo las variables edad, sexo, y riesgo vascular global (REGICOR), y los biomarcadores, microalbuminuria, NA2F, NA3Fb, y NT-proBNP. La actividad de Lp-PLA2 no se utilizó en este análisis ya que su capacidad predictiva independiente se limita a las mujeres.

La microalbuminuria (OR = 2,97, intervalo de confianza 95% 1,34 a 6,57), el NT-proBNP (OR por desviación típica de log NT-proBNP= 1,64, intervalo de confianza 95% 1,16 a 2,31) y los n-glicanos NA2F (OR = 0,44, intervalo de confianza 95% 0,23 a 0,83) y NA3Fb (OR = 2,85, intervalo de confianza 95% 1,23 a 6,58) se mantuvieron como predictores de la presencia de ICS.

Se determinó por último, el valor añadido de los biomarcadores, al modelo clínico planteado. Como se observa en la **figura 17**, el incremento del AUC fue significativo (66% a 77,6%, p-valor=0,005) y también el IDI (18,1%, p-valor<0,001).

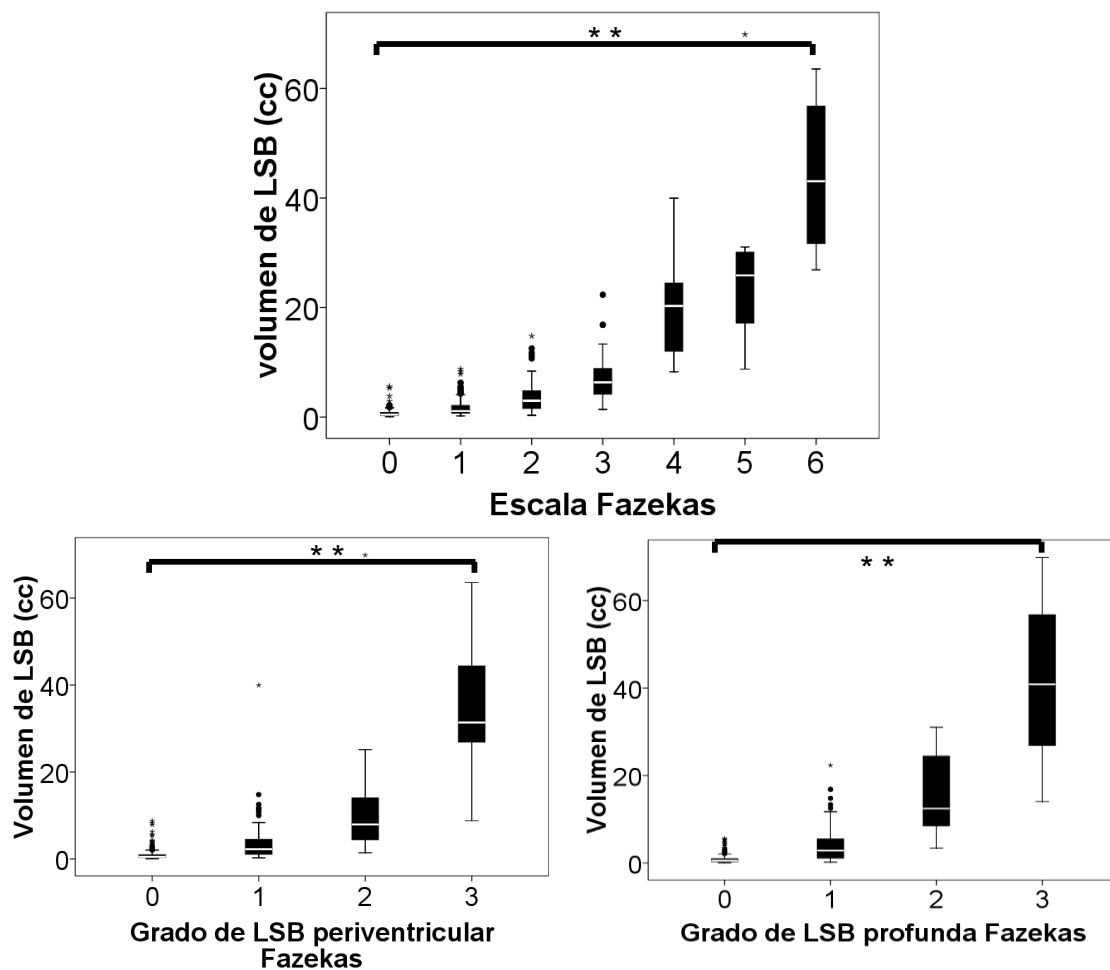
Figura 17. Representación gráfica de las AUC-ROC e IDI para la asociación de los niveles de NA2F, la concentración de NT-proBNP y la presencia de microalbuminuria, con la presencia de ICS.



5.3 Métodos de evaluación de las LSB en el estudio ISSYS:

Las LSB se definieron de forma cualitativa con la escala Fazekas en toda la muestra de 976 pacientes, y se calculó el volumen mediante segmentación semiautomatizada (ver apartado 2.1.3.1) en 404 pacientes. En la **figura 17** se muestra la relación entre el volumen de LSB con la escala de Fazekas total (KW p-valor<0,001), y con las escalas según localización periventricular y profunda (ambos con MW p-valor<0,001).

Figura 18. Concordancia de las medidas de LSB.



**p-valor<0.01.

Con base en estos resultados, los análisis de los biomarcadores en relación a las LSB se llevaron a cabo utilizando la escala Fazekas y el volumen de LSB indistintamente, según el tamaño muestral dada la limitación de la medida de volumen que se evaluó en un menor número de sujetos.

Las LSB se consideraron por separado según la localización periventricular o profunda tal y como está descrito originalmente en la escala de Fazekas (Fazekas, Chawluk et al. 1987). Se definieron como significativas o extensas, en localización periventricular cuando se extendían al subcórtez, y en localización profunda, cuando presentaban confluencia incipiente o total.

En la **tabla 8** se muestra el análisis univariante del volumen de LSB y de las LSB extensas en localización periventricular y profunda.

Aquellos pacientes de más edad, con DM y valores elevados de PAD mostraban lesiones extensas periventriculares, mientras que la edad fue el único factor de riesgo asociado a las lesiones en localización profunda.

El volumen de LSB se asoció con la edad, diabetes mellitus, y con el riesgo vascular global (REGICOR). La edad fue el factor de riesgo común y más importante para ambas medidas de LSB.

5.3.1 Relación de los biomarcadores analizados con la presencia de LSB:

5.3.1.1 Actividad de Lp-PLA2

Los niveles de actividad de Lp-PLA2 no fueron significativamente mayores en aquellos pacientes con lesiones extensas medidas en la escala Fazekas, ni en localización periventricular (p-valor=0,143), ni en localización profunda (p-valor=0,054).

Tabla 8 Análisis univariante para el volumen de LSB y para la presencia de LSB extensas en localización periventricular o profunda.

Características	Volumen LSB	Localización periventricular		Localización profunda	
		<2	=>2	<2	=>2
Edad (años)	0,29**	64(54-67)	65(62-68)**	64(58-67)	66(64-68)**
Sexo:					
• Mujeres	0,81(0,35-2,13)	445(50,9)	42(45,2)	467(50,7)	20(43,5)
• Hombres	1,10(0,46-4,26) **	429(49,1)	51(54,8)	54(49,3)	26(56,5)
Tabaquismo:					
• No	0,96 (0,42-2,99)	739(84,7)	80(86)	781(84,9)	38(82,6)
• Sí	0,91(0,48-2,65)	134(15,3)	13(14)	139(15,1)	8(17,4)
Diabetes Mellitus:					
• No	0,90(0,41-2,86)	673(77)	65(69,9)	703(76,3)	35(76,1)
• Sí	1,30(0,53-3,45)	201(23)	28(30,1)**	218(23,7)	11(23,9)
Dislipidemia:					
• No	0,96(0,47-2,96)	240(27,6)	32(34,4)	256(27,9)	16(34,8)
• Sí	0,94(0,42-2,91)	629(72,4)	61(65,6)	660(72,1)	30(65,2)
Colesterol Total (mg/dl)	0,01	218+/-40,1	249+/-44,2	217+/-40,8	219,3+/-49,4
Presión arterial diastólica (mm Hg)	0,09	77,67+/-9,4	80+/-10**	78+/-9,5	77+/-9,37
Enfermedad vascular establecida:					
• No	0,91(0,42-2,88)	770(88,1)	78(83,9)	811(88,1)	37(80,4)
• Sí	1,41(0,72-3,74)	104(11,9)	15(16,1)	110(11,9)	9(19,6)
REGICOR					
• Riesgo bajo	0,78 (0,34-1,57)	212(24,6)	14(15,2)	219(24,1)	7(15,2)
• Riesgo moderado	0,84(0,37-2,32)	393(45,5)	41(44,6)	414(45,6)	19(41,3)
• Riesgo alto	1,7(0,44-5,16)	117(13,3)	17(18,5)	126(13,9)	8(17,4)
• Riesgo muy alto	1,99 (0,79-4,80) **	141(16,4)	20(21,7)	149(16,4)	12(26,1)

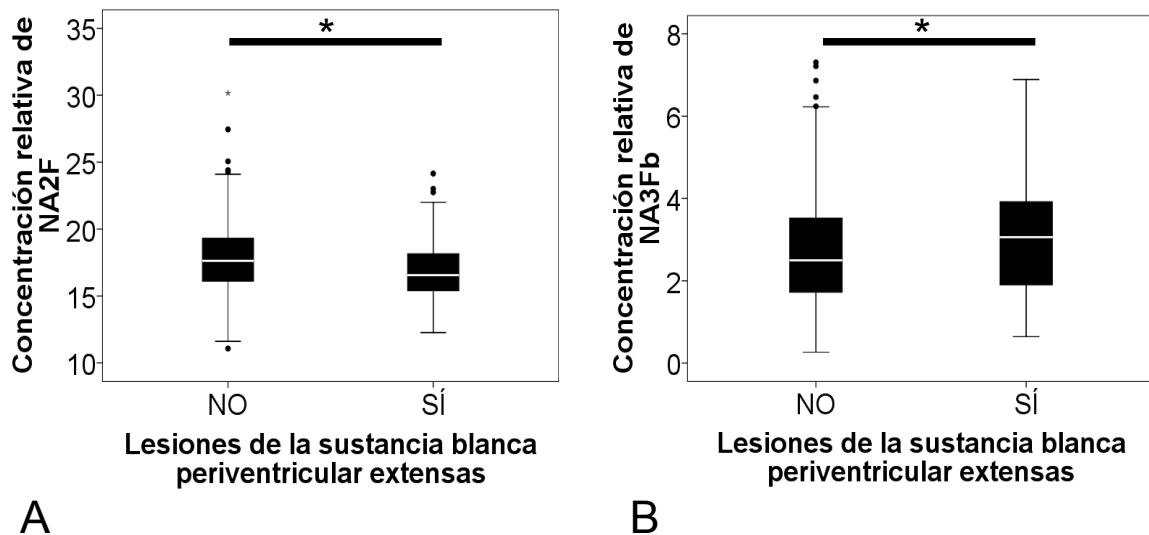
Para el volumen de LSB, los datos se expresaron como mediana (rango intercuartílico) y factor de Pearson. Para la presencia de LSB en cada localización se dan media±desviación típica, mediana (rango intercuartílico) y número de pacientes (porcentajes), según corresponda.

* p-valor<0,050, ** p-valor<0,010.

5.3.1.2 Patrones de N-glicosilación sérica:

Los N-glicanos NA2F y NA3Fb, de los cuales hemos descrito una asociación con los ICS, se asociaron con la presencia de LSB extensas en localización periventricular (p-valor=0,012 y p-valor=0,015 respectivamente), pero no con las LSB de regiones profundas. En la **figura 19** se muestra la representación gráfica de la asociación de NA2F (panel A) y NA3Fb (panel B) con las LSB extensas. Los puntos de corte de dichos N-glicanos previamente seleccionados para ICS se asociaron también de forma significativa con las LSB.

Figura 19. Representación gráfica de la relación entre NA2F y LSB extensas.



Sin embargo, en este caso sólo NA2F, se asoció de manera independiente a los factores de riesgo edad, sexo y riesgo vascular global (REGICOR) con la presencia de LSB en localización periventricular (OR= 0,47, 95%CI(0,30-0,74) p-valor=0,001).

5.3.1.3 NT-proBNP:

Para éste análisis se consideró el volumen de LSB. Se había obtenido el volumen por segmentación semiautomática en 404 pacientes, de los cuales 274, tenían medida de la concentración plasmática de NT-proBNP.

El análisis univariante del volumen de LSB es muy similar al mostrado en el apartado 4.3.1.1. Aquellos pacientes de sexo masculino, de más edad, mayores valores de PAD, y una mayor puntuación en la escala REGICOR, mostraron mayores volúmenes de LSB de forma significativa. La media del volumen de LSB en ésta muestra fue de 0,89 cc (0,44-2,74), y se correlacionó de forma significativa con los niveles de NT-proBNP ($R=0,174$, $p\text{-valor}=0,004$).

Se construyeron tres modelos de regresión lineal, cuyas características se han descrito en el apartado 5.2.5.3., el biomarcador permaneció como predictor independiente del volumen de LSB de forma consistente en los tres modelos. Adicionalmente, se analizó la relación de los niveles de NT-proBNP, con las lesiones extensas de LSB medidas con la escala de Fazekas. Aquellos pacientes con LSB extensas en una localización u en otra, mostraron niveles de NT-proBNP significativamente más elevados que aquellos pacientes con lesiones no significativas ($p\text{-valor}<0,001$ y $p\text{-valor}=0,001$, respectivamente)

El NT-proBNP se mantuvo como predictor independiente en ambas localizaciones y de forma consistente en los tres modelos de regresión logística. En la **tabla 9** se muestran los valores Beta y OR por desviación estándar de NT-proBNP en los modelos predictivos para el volumen de LSB y las lesiones en localización periventricular y profunda.

Tabla 9. Análisis multivariante de la relación entre NT-proBNP y LSB.

	OR per SD (95%IC)		
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo3
Volumen LSB (cc)	1,32(0,28-2,35)	2,53(0,30-2,39)	1,44(0,36-2,52)
LSB PV>2	1,88(1,3-2,72)	2,33(1,55-3,5)	2,38(1,55-3,66)
LSB PF>2.	1,7(1,04-2,79)	2,26(1,31-3,91)	2,23(1,25-3,98)

Los valores dados para el volumen de LSB son los valores Beta (IC 95%), para las LSB cuantificadas con la escala Fazekas se dan los valores de OR (IC 95%). Tanto los valores OR como los Beta, están expresados por la desviación estándar de log NT-proBNP.

5.3.1.4 Microalbuminuria:

La microalbuminuria se asoció de forma significativa con la presencia de lesiones extensas en ambas localizaciones como se observa en la **tabla 10**.

La microalbuminuria predijo de forma independiente la presencia de lesiones extensas en localización periventricular (OR= 2,34, 95%CI (1,34-4,07) p-valor=0,003) y profunda (OR= 3,15, 95%CI (1,58-6,26) p-valor=0,001), después de ajustar por los factores de riesgo edad, sexo y riesgo vascular global (REGICOR).

Tabla 10. Tabla de contingencia de la asociación de la microalbuminuria con las LSB extensas en localización periventricular y profunda.

Localización de las LSB	Microalbuminuria	
	No	Sí
LSB periventriculares extensas:		
• No	727(91,4)	99(82,5)
• Sí	68(8,6)	21(17,5)**
LSB profundas extensas:		
• No	763(96)	107(89,2)
• Sí	32(4)	13(10,8)**

Los datos en las celdas corresponden al número de pacientes y el porcentaje entre paréntesis. **p-valor<0.010.

5.3.5 Resumen de los hallazgos:

Los biomarcadores descritos excepto Lp-PLA2, se asociaron bien con la presencia de LSB extensas en las diferentes localizaciones (NA2F, NA2Fb, NT-proBNP y microalbuminuria), o con el incremento del volumen de LSB (NT-proBNP). Pero tras el ajuste por los factores de riesgo, sólo NA2F, la microalbuminuria y NT-proBNP permanecieron como predictores independientes de la presencia de lesiones extensas y/o volumen de LSB.

Estos resultados son pues consistentes con una asociación similar de estos marcadores, tanto con los ICS como con las LSB

5.4 Cálculo de una escala de pequeño vaso cerebral y factores clínicos asociados.

Dado que hemos mostrado que diversos biomarcadores pueden ser factores de riesgo tanto de ICS como de LSB, y ya que se conoce que en la EPVC dichas lesiones coexisten muy a menudo, nos interesamos en este último apartado en evaluar la combinación de marcadores de EPVC, calculando una escala ordinal ya descrita previamente.

Con las lesiones identificadas en la RM, ya descritas previamente, se calculó una escala ordinal (de 0 a 4 puntos) para valorar el grado de EPVC. La definición de dicha escala se encuentra en el apartado 4.1.2.1. Para el análisis estadístico, se fusionaron las categorías 3 y 4 en una, debido al reducido número de pacientes en cada una en comparación con las categorías 0, 1 y 2.

Solo 1,74% de los pacientes mostraron tres o más marcadores de EPVC (categoría 3), mientras que el 6,66% mostraron dos marcadores (categoría 2) y el 19,9% sólo uno de los marcadores (categoría 1). Por lo tanto, en esta muestra de sujetos hipertensos, un 28,3% de los sujetos presentaron, como mínimo un marcador de EPVC. El resto de los pacientes no mostraron ningún marcador de EPVC. El marcador más frecuente en aquellos pacientes con un punto en la escala, fue la presencia moderada de EPVD en los ganglios basales (77,1%), seguido de la presencia de uno o más infartos lacunares (12,5%), las LSB extensas (7,3%) y los microsangrados profundos (3,1%). Los marcadores aparecían en todas las combinaciones posibles, y el más frecuente, en cada combinación fueron los EPVD.

En la **tabla 11** se muestran las características asociadas a los grados de EPVC. Los pacientes de más edad, de sexo masculino, con mayor riesgo vascular global, mayor ratio albúmina creatinina, mostraban puntuaciones más altas en la escala.

Tabla 11. Análisis univariante de los grados de EPVC

Características	Grado 0 n=700	Grado 1 n=194	Grado 2 n=65	Grado 3 n=17
Edad (años)	63 (58-67)	65 (61-68)	66 (63-68)	66 (63-70)**
Sexo (masculino)	47,3%	51%	57,6%	82,4%**
Tabaquismo	14,9%	16,1%	16,7%	11,8%
Abuso de alcohol	6,1%	10%	2,6%	0%
Dislipidemia	72,3%	68,4%	77,3%	64,7%
Diabetes mellitus	22,1%	26,6%	27,3%	23,5%
IMC, Kg/m ²	30 (27,1-33,2)	30,2(27,8-33,3)	29,4 (26,8-33,9)	28,3(26,1-31,1)
REGICOR				
- Riesgo bajo	25,5%	24,6%	9,2%	5,9%*
- Riesgo moderado	46,3%	42,9%	40%	47,1%
- Riesgo alto	12,5%	16,8%	20%	23,5%
- Riesgo muy alto	15,7%	15,7%	30,8%	23,5%
Enfermedad vascular establecida				
	11.4%	12%	22.7%	5.9%
Media PAS, mmHg	142 (133-152)	142 (129-155)	144 (131-156)	146 (135-174)
Media PAD, mmHg	78 (71-84)	79 (71-84)	79 (72-84)	84 (73-88)
Ln UACR	2,0+/-1,1	2,2+/-1,2	2,3+/-1,4	2,9+/-1,4**
Microalbuminuria	12%	15,8%	21%	52,9%**

* p-valor<0,050; ** p-valor<0,010

5.4.1 Biomarcadores asociados con el grado de EPVC.

Al estudiar la relación entre los biomarcadores descritos con anterioridad y la escala de EPVC, se encontraron asociaciones significativas entre la escala de EPVC y los niveles de actividad de Lp-PLA2, de NT-proBNP, y de los n-glicanos NGA2F, NGA2FB, NA2F y NA3Fb (pico 1, 2, 6 y 9 respectivamente), así como con el ratio albúmina creatinina. En la **tabla 12** se muestran las relaciones entre los distintos biomarcadores y el grado de EPVC en el análisis univariante.

Tabla 12. Biomarcadores asociados al grado de EPVC.

Biomarcador	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Actividad de LpPLA2	178(150-213)	181,5(153-217)	186,5(164,5-215,5)	254(165-281,5)**
Log NT-proBNP	1,7+/-0,4	1,9+/-0,4	2 +/-0,5 **	1,9+/-0,4
Microalbuminuria, sí	12%	15,8%	21%	52,9%**
NGA2F	9,3(7,6-11,4)	10 (7,8-12,3)	9,7(7,9-12,1)	11,2(10,2-13,3)**
NGA2FB	1,8(1,5-2,3)	1,9(1,6-2,4)	2 (1,6-2,5)	2,2(1,9-2,8)**
NG1A2F	6 (5,2-6,9)	6,1(5,3-7,1)	5,7(5,1-6,7)	6,9(5,2-7,2)
NG1A2F	4,7(4,1-5,4)	4,6 (4-5,3)	4,5 (4,1-5,1)	5,1(4,2-5,7)
NA2	41,6+/-4,4	41,5+/-4,4	41,4+/-4,3	40,8+/-3,2
NA2F	17,7(16,3-19,3)	17,1 (15,9-19,3)	16,6 (15 1-18,7)	16(15,4-17,6)**
NA2FB	6,1 (5,3-7,1)	6 (5,1-7,1)	6,2 (5,2-7,3)	5,9 (5,2-7,5)
NA3	7,4(6 -8,9)	7,1 (6-8,6)	7,7(6,3-9,3)*	6,3(5,4-6,9)
NA3Fb	2,5(1,7-3,5)	2,7(1,8-3,5)	2,7 (2,1 -4)	3,5(2,7-4,3)**

* p-valor<0,05, **p-valor<0,01.

5.4.2 Análisis multivariante y resumen de los hallazgos:

Los biomarcadores actividad de Lp-PLA2, NGA2F, NGA2BF, NA2F, NA2Fb, NT-proBNP y microalbuminuria se relacionaron por separado, con el incremento del grado de EPVC; sin embargo, tras el ajuste realizado mediante análisis de regresión ordinal por los factores de riesgo edad, sexo y REGICOR, los predictores independientes, resultaron ser únicamente, la microalbuminuria y la concentración de NT-proBNP.

Como se observa en la **tabla 13**, en el modelo clínico incluyendo ambos biomarcadores y los factores de riesgo edad, sexo y REGICOR, los predictores independientes del incremento del grado de EPVC fueron el incremento de la edad, la presencia de microalbuminuria y concentraciones crecientes de NT-proBNP.

Tabla 13. Análisis multivariante para el grado de EPVC.

Variables	Grado de EPVC (OR/95%IC)
	Modelo clínico
Edad	1,11(1,05-1,17)
Sexo (hombres)	1,63(0,92-2,88)
REGICOR	1,01(0,80-1,27)
Microalbuminuria	2,45(1,25-4,79)
Log NT-pro-BNP	1,57(1,19-2,07)

Modelo clínico ajustado por edad, sexo, y REGICOR. Valores de OR, por año de edad, por sexo masculino, por incremento de categoría en REGICOR, por presencia de microalbuminuria y por DS del log NT-proBNP

Discusión de los resultados 6

6.1 Enfermedad de pequeño vaso cerebral y biomarcadores:

La prevención es un abordaje clave en enfermedades cerebrovasculares como la EPVC puesto que no se conoce un tratamiento determinado y efectivo. Un adecuado manejo de los factores de riesgo resulta esencial para disminuir la incidencia de ésta enfermedad, que en muchos casos pasa desapercibida hasta la aparición de síntomas, cuando la enfermedad está avanzada y las probabilidades de sufrir un ictus o demencia ya son muy elevadas.

El análisis de los biomarcadores asociados, podría contribuir a la detección temprana de los signos de EPVC mediante la identificación de las lesiones cerebrales cuando todavía no se han producido síntomas, esto es, cuando son silentes o subclínicas.

El **anexo I** recoge la revisión de la literatura realizada como parte de esta tesis doctoral. La gran mayoría de estudios de biomarcadores que se han llevado a cabo en el campo de la enfermedad cerebrovascular silente, definen asociaciones transversales con marcadores de imagen, pero no se ha conseguido establecer su capacidad diagnóstica discriminativa y predictiva, ni tampoco la combinación de diferentes marcadores para obtener puntuaciones de utilidad clínica.

Una de las principales limitaciones del estudio de biomarcadores y su utilidad clínica es la falta de replicación de los hallazgos en cohortes independientes. Esto se debe en parte, a la falta de consenso en los criterios diagnósticos de las lesiones de EPVC en el pasado, las diferentes formas de proporcionar los resultados (escalas cuantitativas o cualitativas), diferentes diseños del estudio y métodos estadísticos. Para superar estas limitaciones, se están desarrollando y estableciendo definiciones y estándares de adquisición de imagen para el estudio de la EPVC (Wardlaw, Smith et al. 2013).

El estudio de paneles diagnósticos de biomarcadores implicados en diferentes vías se debe ampliar, y replicar los resultados publicados, puesto que constituye una visión más real de la fisiología de la enfermedad, ya que no se trata de una serie de alteraciones que suceden de forma aislada, sino de muchas vías y procesos relacionados que se alteran en cadena.

Además sería de gran interés el estudio de marcadores subrogados para factores de riesgo vascular, para encontrar candidatos e incorporarlos a los paneles.

Por último, gracias a los resultados obtenidos de los estudios poblacionales longitudinales, se está obteniendo más información acerca de la evolución y acúmulo de lesiones en el tiempo, así como de los biomarcadores asociados a ésta progresión. Con todo ello, se podrá establecer la utilidad diagnóstica de los mismos en la predicción del curso clínico de la enfermedad y también, monitorizar la respuesta a los tratamientos. Falta por determinar si los biomarcadores cambian en el tiempo de forma paralela con la acumulación de lesiones o con el declive cognitivo y si podrían usarse como marcadores subrogados de la progresión de la enfermedad.

En esta tesis doctoral hemos seleccionado una serie de marcadores candidatos, y hemos observado que tienen un papel como factor de riesgo de infartos silentes (y otras lesiones vasculares cerebrales silentes como las LSB). Sin embargo, su capacidad predictiva o la mejoría que producen en la discriminación de las lesiones es escasa, sobretodo cuando se evalúan de forma individual y probablemente desde un punto de vista clínico, es insuficiente.

Sin embargo nuestros datos apoyan el uso combinado de varios marcadores para mejorar su capacidad diagnóstica. En este aspecto, posiblemente combinar biomarcadores de distintas familias o asociados a diferentes vías pueda ser de mayor utilidad, al cubrir un mayor campo de la fisiopatología de la enfermedad.

6.2 Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas y EPVC

La elección de los marcadores biológicos evaluados en esta tesis se ha basado en su papel biológico en enfermedades similares y en la falta de estudios al respecto en el contexto de la enfermedad.

En concreto, la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂) es un marcador establecido para riesgo de enfermedad coronaria. La Administración norteamericana de alimentos y fármacos (FDA del inglés *US Food and Drug Administration*) ha aprobado recientemente el uso del test de actividad *PLAC[®] Test for Lp-PLA₂ Activity; diaDexus* con esa indicación; el test para la masa de Lp-PLA₂ (*PLAC[®] Test ELISA Kit, diaDexus*) fue aprobado por la misma administración en 2003. Se ha descrito una correlación moderada entre masa y actividad de Lp-PLA₂ y se ha propuesto que la actividad podría reflejar el estado inflamatorio mejor que la masa (Persson, Hedblad et al. 2007). No obstante, como predictores de eventos cardiovasculares, ambas medidas habían mostrado resultados similares (Thompson, Gao et al. 2010), (Garg, McClelland et al. 2015). Aunque, la falta de precisión de la masa de Lp-PLA₂ en la estratificación del riesgo de enfermedad cardiovascular, ha conducido al abandono de los ensayos de masa de Lp-PLA₂ en pos del uso de los ensayos enzimáticos de actividad (Maiolino, Bisogni et al. 2015).

La actividad de Lp-PLA₂ ha sido analizada en relación a la aparición de nuevos eventos en pacientes con un evento isquémico transitorio (Massot, Pelegri et al. 2011). y en el caso de pacientes con ateromatosis intracraneal sintomática (Delgado, Chacon et al. 2012). Pero, hasta la fecha no se ha publicado ningún trabajo que aborde la relación de la actividad de Lp-PLA₂ con la presencia de lesiones de EPVC.

En la bibliografía encontramos dos trabajos en los que se ha estudiado el papel de la masa de Lp-PLA2 relacionado con lesiones de EPVC: el primero es un trabajo del estudio NOMAS (Northern Manhattan Study), en que se describe la asociación de la masa de Lp-PLA2 con el volumen de LSB en una cohorte de población de 527 hispanos, negros y blancos, sin ictus previo (Wright, Moon et al. 2009). En el segundo trabajo, se describe la asociación de la masa de Lp-PLA2 tanto con la presencia de ICS como con la presencia de lesiones extensas de LSB, en 1763 participantes de la cohorte *Framingham offspring*, libres de ictus (Shoamanesh, Preis et al. 2015).

Como se detalla en los apartados correspondientes de Iso resultados, y en el **anexo II**, hemos descrito la relación entre la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS en una cohorte de pacientes hipertensos.

Nuestros resultados apuntan a una asociación entre los niveles de actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS en mujeres. La diferencia en los niveles de actividad de Lp-PLA2 entre sexos fue de un 19%, mientras que datos de una revisión sistemática que comprendía más de 500 individuos mostraban diferencias de hasta un 10% (Gregson, Stirnadel-Farrant et al. 2012). Estas diferencias pueden deberse a los niveles de estrógenos, que regulan la disminución de la actividad de Lp-PLA2 y además disminuyen los niveles del colesterol de tipo LDL (Brilakis, Khera et al. 2008).

Respecto a la interacción del sexo en la asociación de la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS, se había descrito una relación similar para la IL-6 y el volumen de LSB y LCR (Satizabal, Zhu et al. 2012). Pero en otro estudio, no encontraron ninguna interacción del sexo en la asociación de la masa de Lp-PLA2 y el volumen de LSB (Wright, Moon et al. 2009).

Respecto a la relación con las LSB, en nuestro estudio no se han encontrado diferencias en los niveles de actividad de Lp-PLA2 en pacientes con o sin lesiones extensas.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en la *Framingham offspring*, que describen la relación de la masa pero no de la actividad, con las LSB extensas, integradas en un índice de lesiones de EPVC isquémicas, junto con la presencia de ICS. No obstante, resulta difícil comparar con nuestros resultados porque en éste estudio se dicotomizó la variable del volumen de LSB mediante el uso de la desviación típica de la media del volumen ajustado por la edad, que como se ha comentado antes, es el factor de riesgo descrito más importante para las LSB. Además, la etiología de LSB podría variar según la localización, aunque este aspecto no está suficientemente aclarado; se ha descrito que las lesiones en localización profunda tienen su origen en la EPVC; mientras que las lesiones periventriculares se asocian con procesos de desmielinización, ependimitis granularis y gliosis subependimal, en definitiva, cambios que no son de naturaleza isquémica (Kim, MacFall et al. 2008), (Wardlaw, Smith et al. 2013). La medida cuantitativa de LSB en volumen, tiene ventajas sobre las escalas visuales, pero no permitiría diferenciar la etiología de las LSB. Teniendo en cuenta éstas posibles diferencias etiológicas, las diferencias en la cuantificación de las lesiones, el tipo de medida de Lp-PLA2, y en las características de las poblaciones de estudio, la relación de Lp-PLA2 y las LSB sigue siendo desconocida.

A pesar de que la Lp-PLA2 es un marcador establecido, de aterosclerosis de gran vaso, nuestros indicios, junto con los de otros grupos (Ho, Witteman et al. 2009), podrían apuntar a una asociación con EPVC. El papel fisiológico se desconoce todavía aunque inicialmente se había propuesto como un claro agente anti-inflamatorio dada su capacidad de hidrolizar el factor activador de plaquetas, y oxidar las lipoproteínas de baja densidad, por otro lado se ha descrito su carácter pro-inflamatorio debido a sus productos de reacción como la lisofosfatidilcolina y los ácidos grasos libres oxidados. No obstante se sabe que promueve de forma directa la aterogénesis en las placas vulnerables.

Puesto que el ictus es una de las primeras causas de mortalidad en mujeres en nuestro país, sería interesante replicar estos resultados en cohortes independientes y analizar la relación con otras lesiones de RM como veremos más adelante.

A pesar de que hemos descrito la asociación entre la actividad de Lp-PLA2 y la presencia de ICS en mujeres, no encontramos una mejoría al añadir el marcador en el modelo clínico para la discriminación de los ICS.

Por tanto aunque el uso de biomarcadores como la actividad de Lp-PLA2 podría ser potencialmente útil en la selección de individuos de alto riesgo para ensayos en prevención, nuestros resultados solo indicarían utilidad en las mujeres.

6.3. Perfil de N-glicosilación en suero y EPVC:

A pesar de la gran variedad de proteínas y lípidos que pueden contener secuencias de N-glicanos, añadidas a su paso por el sistema del retículo endoplasmático en los procesos de post-traducción, varios estudios han descrito patrones específicos en enfermedades como el carcinoma hepatocelular (Vanhooren, Liu et al. 2009), y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Schedin-Weiss, Winblad et al. 2014), (Wang, Liu et al. 2014), e incluso asociados al envejecimiento (Ruhaak, Uh et al. 2011), (Vanhooren, Dewaele et al. 2010). En el suero humano se ha descrito un perfil de N-glicanos que es estable al menos en un corto periodo de tiempo. Como se muestra en la **figura 12**, cada pico representa una estructura de n-glicano diferente y se obtiene su concentración relativa a la concentración total de cada n-glicano en la muestra (Liu, Desmyter et al. 2007).

El ratio de las concentraciones relativas de los NGA2F (pico 1) y NA2F (pico 6), se encontró muy relacionado con el incremento de la edad en dos poblaciones independientes y se definió como GlycoAge Test. Este ratio permanecía estable en los pacientes, hasta la edad de 40 años, a partir de la cual comenzaba incrementar gradualmente.

En el mismo trabajo se analizó la correlación en pacientes con demencia, que mostraron valores del ratio mayores que los pacientes sin demencia. Este grupo ha propuesto el GlycoAge test como un marcador de edad biológica, que aporta más información que la edad cronológica, y puede ser usado como un marcador de envejecimiento en pacientes sanos, para monitorizar el envejecimiento normal (Vanhooren, Dewaele et al. 2010).

Pero sería interesante replicar estos resultados teniendo en cuenta los factores de riesgo asociados, como se hizo después en una cohorte independiente en el estudio Leiden. En esta cohorte se describió un patrón asociado con la longevidad y uno de los n-glicanos, como marcador de enfermedad cardiovascular, de forma independiente a los factores de riesgo. Además se encontró que las mujeres mostraban asociaciones más fuertes con patrones concretos, que los hombres (Ruhaak, Uh et al. 2011). El hecho de que estas asociaciones en mujeres también cambien entre los grupos de edad de 40 a 49 años y 50 a 59 años, sugiere una influencia de los estrógenos, como se hipotetiza también para la Lp-PLA2.

Como se describe en los apartados correspondientes de los resultados, y en el **anexo III**, en el estudio ISSYS, hemos descrito por primera vez que el perfil de N-glicosilación se relaciona con la presencia de ICS y LSB de forma independiente a la edad y a la presencia de factores de riesgo vascular. Es importante destacar que la concentración relativa de los N-glicanos se asocia de forma clara, con varios factores de riesgo vascular clásicos y que éstos se tuvieron en cuenta en el análisis multivariante, mientras que las asociaciones de los N-glicanos, descritas con otras indicaciones comentadas anteriormente, se basan en correlaciones y análisis univariantes.

Estos hallazgos concuerdan con los resultados de un estudio poblacional, que describió la relación entre diferentes N-glicanos y factores de riesgo como la edad, sexo, tabaquismo, lípidos circulantes, y medidas de obesidad.

Como en nuestro estudio, la edad y dichos factores de riesgo sólo explicaban una pequeña parte de la variabilidad en el perfil de N-glicosilación, que por otra parte, se ha descrito fuertemente asociado con la base genética y/o con condiciones fisiopatológicas determinadas (Knezevic, Gornik et al. 2013)

En nuestro caso, aunque los valores de sensibilidad y especificidad de los puntos de corte seleccionados para NA2F (pico 6) y NA3Fb (pico 9), fueron bajos, la adición de los n-glicanos al modelo clínico resultó en un incremento de la capacidad predictiva para la presencia de ICS. Esta asociación fue independiente a la de otros biomarcadores predictores de ICS ya descritos en el estudio. No obstante la precisión diagnóstica del modelo clínico incluyendo los n-glicanos, necesitaría mejorar para poder ser de utilidad desde un punto de vista clínico.

La relación de NA2F con las LSB extensas en localización periventricular pero no en localización profunda podría explicarse por las diferencias en los mecanismos fisiopatológicos antes mencionados. La limitación del número de pacientes con valores de volumen de LSB nos impidió determinar si había una asociación consistente con un tipo de medida y otra.

Los patrones de n-glicosilación que describimos en ésta tesis, podrían ser señales de los cambios estructurales y de función de las proteínas que participan en la fisiopatología de la enfermedad, y por tanto, marcadores candidatos para identificar dianas terapéuticas para su uso en el futuro como biomarcadores.

6.4. NT-proBNP y EPVC

El NT-proBNP se considera un marcador de daño cardíaco subclínico y dados los factores comunes entre las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, éste marcador podría estar relacionado con el daño subclínico de la vasculatura cerebral (Bezerra, Sharrett et al. 2012) (Kim, Lee et al. 2011).

En ésta tesis doctoral, hemos descrito que los niveles plasmáticos de NT-proBNP se asocian con la presencia de ICS en nuestra población, de forma independiente a la enfermedad cardíaca previa y fibrilación auricular. Otros estudios previos habían excluido a éste tipo de participantes, y los resultados mostraron también una asociación entre el marcador y, la presencia y progresión de ICS y LSB (Dadu, Fornage et al. 2013).

En nuestro caso, el NT-ProBNP esta asociado de forma independiente con la presencia de ICS, aun considerando de forma conjunta otros marcadores.

La selección de pacientes para realizar la medida de NT-proBNP condujo al enriquecimiento en hombres de la muestra, pues son los que presentan ICS de forma más frecuente, no obstante, los pacientes seleccionados, sólo se diferenciaron en este aspecto de aquellos en los que no obtuvimos la medida de NT-ProBNP.

Las diferencias entre sexos no fueron significativas en nuestro estudio, aunque sí se han descrito diferencias significativas población envejecida (>70años), donde los valores más elevados correspondían a los hombres (Nadrowski, Chudek et al. 2013), mientras que en un estudio en población más joven, se determinaron niveles de NT-proBNP más elevados en mujeres (Fradley, Larson et al. 2011).

Aunque se conocen las diferencias entre sexos en los niveles de péptidos natriuréticos circulantes, los mecanismos subyacentes no se han determinado (Costello-Boerrigter, Boerrigter et al. 2006), (Saenger, Dalenberg et al. 2009).

Hemos descrito una asociación consistente, e independiente de factores de riesgo con las LSB, medidas de forma visual (lesiones extensas) o de forma cuantitativa (volumen), ésta última asociación se describió previamente en pacientes diabéticos (Reinhard, Garde et al. 2012). Sin embargo, en otro estudio en el cual se combinaron biomarcadores implicados en diferentes vías como inflamación, hemostasia, actividad neurohormonal y daño endotelial, en un panel de biomarcadores para la predicción de ICS o LSB, no se encontró asociación ni con los niveles de BNP ni de NT-proBNP (Pikula, Beiser et al. 2012).

Otro estudio reciente (AGES-Reyjavik cohort) ha mostrado que el NT-proBNP se asocia a cambios en la estructura cerebral (volumen cerebral total, de sustancia gris y sustancia blanca), así como con cambios de la función cognitiva (funciones de memoria, velocidad de procesamiento y ejecutiva) (Sabayan, van Buchem et al. 2015). Como en nuestro caso, estas asociaciones fueron independientes de la enfermedad cardíaca previa (evaluada mediante el gasto cardíaco medido por resonancia magnética cardíaca), lo cual podría indicar que hay mecanismos específicos en los cuales participa el NT-proBNP, que no están directamente relacionados con la enfermedad cardíaca, pero sí con los procesos de envejecimiento cerebral.

Nuestros pacientes tienen un riesgo elevado de arterioesclerosis y daño vascular sistémico por la hipertensión que todos ellos padecen, de hecho, la hipertensión es una causa muy común de estrés de la pared ventricular y daño subclínico y sintomático del cerebro (Pries and Secomb 2002). Por tanto la asociación de NT-proBNP con las lesiones de EPVC podría relacionarse con ésta condición común (Henskens, van Oostenbrugge et al. 2009).

6.5 Combinación de los biomarcadores de estudio en la predicción de ICS:

Hemos descrito cinco biomarcadores que predicen de forma independiente a los factores de riesgo, la presencia de ICS en la cohorte del ISSYS, no obstante la capacidad diagnóstica global y el incremento de la discriminación cuando se añadieron por separado en los modelos clínicos ha sido discreta o no significativa.

Para obtener mayor capacidad diagnóstica global hemos combinado estos biomarcadores que están involucrados en diferentes vías moleculares como se describe en el apartado 5.2.5. La predicción de ICS con la combinación de biomarcadores incrementó hasta un 41%. El uso de ésta combinación junto con la información clínica, nos permitiría seleccionar de forma más precisa, aquellos pacientes en el grupo de alto riesgo de ICS, que serían candidatos para realizar un estudio de RM, en el cual la proporción de hallazgos sería de casi la mitad. Estos pacientes serían además candidatos para efectuar un seguimiento más exhaustivo y aplicar posibles tratamientos.

6.6 Utilidad de una escala de EPVC y asociación con biomarcadores:

El estudio de la EPVC puede abordarse desde el análisis individual de las lesiones de RM por separado, como hemos planteado en la primera parte de esta tesis, o como una serie de lesiones que se inician y progresan de forma conjunta en un mismo periodo de tiempo. Este segundo enfoque global, parece más apropiado desde el punto de vista fisiológico, puesto que los mecanismos fisiopatológicos subyacentes en un individuo, suceden de forma encadenada y no aislados del resto de la fisiología "no patológica".

No obstante no hay una tendencia clara en el orden en que aparecen estos marcadores de EPVC, y como en nuestro caso, se ha descrito casi cualquier combinación (Henskens, van Oostenbrugge et al. 2009), (Pantoni 2010), (Wardlaw, Smith et al. 2013).

Las lesiones que componen la escala, tienen probablemente origen en la EPVC de origen arterioesclerótico, y se consideran marcadores de la misma, además se definieron siguiendo los criterios del STRIVE, como hemos mencionado anteriormente (Wardlaw, Smith et al. 2013).

La medida del grado de EPVC es más compleja que el método que hemos empleado. Cada una de las lesiones definidas tiene el mismo peso en la escala, pero no se puede afirmar que un infarto supone el mismo daño cerebral que un microsangrado.

Las LSB extensas se consideraron cuando se extendían al subcórtez en localización periventricular, y cuando confluían de forma incipiente o total en regiones profundas del subcórtez. Se valoraron igual en una y otra localización a pesar de que, como ya se ha planteado, posiblemente se trate de lesiones de diferente origen (Kim, MacFall et al. 2008). Sin embargo, estos puntos de corte de las LSB en ambas localizaciones no se basan en una valoración arbitraria, si no que tiene en cuenta la severidad de las lesiones en estudios patológicos (Fazekas, Kleinert et al. 1993).

No hemos tenido en cuenta la progresión de las lesiones porque se trata de un estudio transversal, pero otros ya han descrito la progresión en el tiempo de LSB e infartos, aunque no han tenido en cuenta los EPVD ni los microsangrados (Conklin, Silver et al. 2014). Otros, han estudiado la progresión de las lesiones en relación al deterioro cognitivo (van Sloten, Sigurdsson et al. 2015).

Los EPVD han sido considerados recientemente como componentes de la EPVC. Se ha propuesto que la disfunción de la barrera hematoencefálica, que permitiría el paso de moléculas del torrente sanguíneo a los espacios perivasculares, es uno de los primeros mecanismos en el curso de la EPVC (Wardlaw, Smith et al. 2013), (Farrall and Wardlaw 2009), (Wardlaw, Dennis et al. 2001). Los EPVD serían marcadores del inicio de la enfermedad, puesto que su prevalencia es elevada de forma consistente en comparación con otras lesiones en los estudios en que se han considerado (Klarenbeek, van Oostenbrugge et al. 2013), (Deramecourt, Slade et al. 2012).

Respecto a los factores asociados con el incremento de puntuación en la escala, en nuestra población hemos descrito el incremento de la edad, el sexo masculino, un mayor riesgo vascular global (REGICOR). Además hemos encontrado (no se muestran los datos), que aquellos pacientes que tomaban más fármacos para el control de la hipertensión, mostraron también un mayor grado de EPVC.

Estos factores condicionan en cada caso la severidad de las lesiones y deben ser tenidos en cuenta en los estudios futuros. Las limitaciones de interpretación de este análisis, vienen dadas por la naturaleza ordinal de la variable de la escala, las OR obtenidas en el análisis multivariado pueden ser interpretadas como probabilidad de cambio de categoría pero no es un elemento útil para la práctica clínica.

En nuestro caso hemos descrito dos predictores independientes del grado de EPVC, la microalbuminuria, y la concentración NT-proBNP, pero su capacidad predictiva en el modelo clínico no ha sido analizada por la complejidad estadística, al tratarse de una escala ordinal.

El curso clínico de la EPVC de origen arterioesclerótico sigue siendo una incógnita para la práctica clínica, puesto que se inicia de forma asintomática o silente, y se desconocen en gran medida cuáles son los factores que condicionan su progresión.

A pesar de que ya hay estudios longitudinales (Conklin, Silver et al. 2014), (Pikula, Beiser et al. 2012), se precisa de replicación de resultados y una uniformización de la definición de las lesiones para poder hacer estudios comparativos entre las diferentes cohortes.

Aunque no lo hemos desarrollado en esta tesis, los estudios genéticos en el campo de la EPVC han definido algunas variantes genéticas asociadas a las lesiones, el estudio masivo de genes (GWAS) permite identificar nuevos biomarcadores hasta ahora no descritos.

La importancia del establecimiento de los biomarcadores predictivos de la EPVC radica también en su potencial como dianas terapéuticas para el tratamiento y /o la monitorización de la enfermedad.

Esta herramienta, junto con el manejo de los factores de riesgo modificables comentados anteriormente, podrían contribuir elaborar unas pautas para un envejecimiento sano, libre de ictus o demencia.

6.7 Fortalezas y limitaciones del estudio de biomarcadores del ISSYS:

Los puntos fuertes del estudio de biomarcadores recogido en esta tesis doctoral incluyen el diseño y tamaño muestral de la cohorte del estudio ISSYS. Disponíamos de datos de imagen cerebral, así como de una gran cantidad de variables clínicas recogidas en una base de datos. Las técnicas utilizadas para la medida de los biomarcadores son técnicas estandarizadas y de uso común en el hospital, de modo que su obtención es sencilla, y de bajo coste, excepto para el NT-proBNP. Los análisis estadísticos aplicados han sido robustos, incluyendo uso de modelos de regresión y su comparación mediante test estadísticos establecidos, y con la mayor potencia estadística posible. Además la combinación de biomarcadores implicados en diferentes mecanismos fisiopatológicos aporta consistencia a los resultados.

Las limitaciones incluyen el carácter transversal del estudio que nos impide establecer relaciones causales en la asociaciones establecidas, la falta de medios económicos para realizar la medida en la cohorte completa del NT-proBNP, y la falta de replicación de los resultados en cohortes independientes.

Respecto al marcador NT-ProBNP, sólo pudimos obtener los valores en 278 pacientes, lo cual disminuye la potencia estadística de los análisis en que lo hemos incluido.

Por último, los resultados de éste estudio sólo podrían generalizarse a población hipertensa ya que todos los participantes comparten este factor de riesgo vascular, y deben por tanto, considerarse de naturaleza exploratoria, requiriendo replicación en cohortes independientes y con otros factores de riesgo, para ser validados.

6.8 Perspectivas:

El estudio ISSYS es un estudio poblacional prospectivo en pacientes hipertensos, uno de sus objetivos es determinar los determinantes y pronóstico de las lesiones cerebrovasculares silentes.

El estudio de biomarcadores en el estudio ISSYS es de carácter transversal, con las implicaciones que ello conlleva, hemos descrito una serie de biomarcadores asociados a la presencia de ICS y LSB en concreto, y al grado de EPVC.

Actualmente se están recogiendo datos clínicos, de RM y muestras biológicas de la última visita de la fase de seguimiento del estudio, con el objetivo de determinar la incidencia y progresión de las lesiones cerebrovasculares silentes, y la incidencia de ictus y/o demencia después de tres años de la visita basal. Los pacientes seleccionados para este seguimiento son aquellos con mayor carga lesional o con indicios de deterioro cognitivo

Al completar esta fase, se dispondrá de datos suficientes para hacer un estudio de progresión de las lesiones y su asociación con los niveles de biomarcadores de la visita basal. Por otra parte sería de interés realizar un análisis de los posibles cambios en los niveles de biomarcadores entre la visita basal y la final para determinar si se relacionan con la progresión de dichas lesiones, o con la incidencia de ictus o demencia.

Conclusiones 7

1. La revisión de la literatura acerca del uso de biomarcadores en la EPVC que hemos realizado, pone de manifiesto la necesidad de homogenizar los criterios diagnósticos para las lesiones detectadas en la RM, replicar los resultados en cohortes independientes y analizar de forma conjunta varios candidatos implicados en diferentes mecanismos.
2. La actividad de la enzima Lp-PLA2 en suero se asocia de forma independiente a la presencia de infartos cerebrales silentes en mujeres, aunque no aumenta de forma significativa su discriminación, añadida a un modelo de factores clínicos.
3. El perfil de N-glicosilación en suero (pico 6(NA2F) y pico 9 (NA3Fb)) se asocia con la presencia y número de infartos silentes y con la presencia de lesiones extensas de la sustancia blanca a nivel periventricular (pico 6(NA2F))
4. El NT-ProBNP plasmático se asocia con la presencia de ICS y LSB de forma independiente a los factores de riesgo vascular.
5. La combinación de microalbuminuria, perfil de N-glicosilación, y NT-proBNP, mejora de forma significativa la discriminación de los ICS en nuestra muestra, en un 18%.
6. El 28.3% de los pacientes hipertensos de nuestra muestra presenta como mínimo un marcador de EPVC (considerando los infartos lacunares, microsangrados profundos, espacios perivasculares dilatados en ganglios de la base y LSB extensas a nivel periventricular o subcortical).
7. Los pacientes de mayor edad, con microalbuminuria y con concentraciones elevadas de NT-ProBNP, mostraron una mayor carga de EPVC, evaluada mediante dicha escala ordinal.

Bibliografía 8

- (1988). "The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators." J Clin Epidemiol **41**(2): 105-14.
- (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 89-95.

a

- Akoudad, S., S. Sedaghat, et al. (2015). "Kidney function and cerebral small vessel disease in the general population." Int J Stroke **10**(4): 603-8.
- Albertsen, I. E., T. F. Overvad, et al. (2015). "Smoking, atrial fibrillation, and ischemic stroke: a confluence of epidemics." Curr Opin Cardiol **30**(5): 512-7.
- Amor, S., L. A. Peferoen, et al. (2014). "Inflammation in neurodegenerative diseases--an update." Immunology **142**(2): 151-66.
- Anan, F., T. Shimomura, et al. (2008). "High-sensitivity C-reactive protein level is a significant risk factor for silent cerebral infarction in patients on hemodialysis." Metabolism **57**(1): 66-70.
- Aono, Y., T. Ohkubo, et al. (2007). "Plasma fibrinogen, ambulatory blood pressure, and silent cerebrovascular lesions: the Ohasama study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(4): 963-8.
- Arboix, A. (2012). "Factores de riesgo, clínica y pronóstico del ictus lacunar. En Montaner .J. Ictus lacunar." Barcelona, Marge Médica Books.
- Arenillas, J. F., M. A. Moro, et al. (2007). "The metabolic syndrome and stroke: potential treatment approaches." Stroke **38**(7): 2196-203.
- Aribisala, B. S., S. Wiseman, et al. (2014). "Circulating inflammatory markers are associated with magnetic resonance imaging-visible perivascular spaces but not directly with white matter hyperintensities." Stroke **45**(2): 605-7.

b

- Berger, K., H. W. Hense, et al. (2000). "A single question about prior stroke versus a stroke questionnaire to assess stroke prevalence in populations." Neuroepidemiology **19**(5): 245-57.
- Bezerra, D. C., A. R. Sharrett, et al. (2012). "Risk factors for lacune subtypes in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." Neurology **78**(2): 102-8.
- Bielecka-Dabrowa, A., A. Gluba-Brzozka, et al. (2015). "The multi-biomarker approach for heart failure in patients with hypertension." Int J Mol Sci **16**(5): 10715-33.
- Bjerke, M., U. Andreasson, et al. (2009). "Subcortical vascular dementia biomarker pattern in mild cognitive impairment." Dement Geriatr Cogn Disord **28**(4): 348-56.
- Brilakis, E. S., A. Khera, et al. (2008). "Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas Heart Study." Atherosclerosis **199**(1): 110-5.

c

- Cesari, M., B. W. Penninx, et al. (2003). "Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study." Circulation **108**(19): 2317-22.
- Conklin, J., F. L. Silver, et al. (2014). "Are acute infarcts the cause of leukoaraiosis? Brain mapping for 16 consecutive weeks." Ann Neurol **76**(6): 899-904.
- Cordonnier, C., G. M. Potter, et al. (2009). "Improving interrater agreement about brain microbleeds: development of the Brain Observer MicroBleed Scale (BOMBS)." Stroke **40**(1): 94-9.

- Costello-Boerrigter, L. C., G. Boerrigter, et al. (2006). "Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide in the general community: determinants and detection of left ventricular dysfunction." J Am Coll Cardiol **47**(2): 345-53.
- Cucchiara, B. L., S. R. Messe, et al. (2009). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 and C-reactive protein for risk-stratification of patients with TIA." Stroke **40**(7): 2332-6.
- Dadu, R. T., M. Fornage, et al. (2013). "Cardiovascular biomarkers and subclinical brain disease in the atherosclerosis risk in communities study." Stroke **44**(7): 1803-8.
- de Leeuw, F. E., J. C. de Groot, et al. (2001). "Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: a population based magnetic resonance imaging study. The Rotterdam Scan Study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **70**(1): 9-14.
- de Leeuw, F. E., M. de Kleine, et al. (2002). "Endothelial cell activation is associated with cerebral white matter lesions in patients with cerebrovascular disease." Ann N Y Acad Sci **977**: 306-14.

d

- Debette, S., J. C. Bis, et al. (2010). "Genome-wide association studies of MRI-defined brain infarcts: meta-analysis from the CHARGE Consortium." Stroke **41**(2): 210-7.
- Delgado, P. (2012). "Epidemiología del infarto silente, el ictus lacunar y la demencia asociada. En Montaner .J. Ictus lacunar. ." Barcelona, Marge Médica Books.
- Delgado, P., P. Chacon, et al. (2012). "Lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity is associated with large-artery atherosclerotic etiology and recurrent stroke in TIA patients." Cerebrovasc Dis **33**(2): 150-8.
- Delgado, P., I. Riba-Llena, et al. (2014). "Prevalence and associated factors of silent brain infarcts in a Mediterranean cohort of hypertensives." Hypertension **64**(3): 658-63.
- DeLong, E. R., D. M. DeLong, et al. (1988). "Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach." Biometrics **44**(3): 837-45.
- Deramecourt, V., J. Y. Slade, et al. (2012). "Staging and natural history of cerebrovascular pathology in dementia." Neurology **78**(14): 1043-50.
- Diaz-Guzman, J., F. Bermejo-Pareja, et al. (2008). "Prevalence of stroke and transient ischemic attack in three elderly populations of central Spain." Neuroepidemiology **30**(4): 247-53.
- Diaz-Guzman, J., J. A. Egido, et al. (2012). "Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study." Cerebrovasc Dis **34**(4): 272-81.
- Doubal, F. N., A. M. MacLulich, et al. (2010). "Enlarged perivascular spaces on MRI are a feature of cerebral small vessel disease." Stroke **41**(3): 450-4.

e

- Economos, A., C. B. Wright, et al. (2013). "Interleukin 6 plasma concentration associates with cognitive decline: the northern Manhattan study." Neuroepidemiology. 2013;40(4):253-9. doi: 10.1159/000343276. Epub 2013 Jan 24.

f

-
- Fan, Y. H., V. C. Mok, et al. (2004). "Cerebral microbleeds and white matter changes in patients hospitalized with lacunar infarcts." J Neurol **251**(5): 537-41.
- Fanning, J. P., A. A. Wong, et al. (2014). "The epidemiology of silent brain infarction: a systematic review of population-based cohorts." BMC Med **12**(1): 119.
- Farrall, A. J. and J. M. Wardlaw (2009). "Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis." Neurobiol Aging **30**(3): 337-52.
- Fassbender, K., T. Bertsch, et al. (1999). "Adhesion molecules in cerebrovascular diseases. Evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large- and small-vessel disease." Stroke **30**(8): 1647-50.
- Fazekas, F., J. B. Chawluk, et al. (1987). "MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging." AJR Am J Roentgenol **149**(2): 351-6.
- Fazekas, F., R. Kleinert, et al. (1993). "Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities." Neurology **43**(9): 1683-9.
- Fisher, C. M. (1965). "Lacunes: Small, Deep Cerebral Infarcts." Neurology **15**: 774-84.
- Fornage, M., Y. A. Chiang, et al. (2008). "Biomarkers of Inflammation and MRI-Defined Small Vessel Disease of the Brain: The Cardiovascular Health Study." Stroke **39**(7): 1952-9.
- Fradley, M. G., M. G. Larson, et al. (2011). "Reference limits for N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide in healthy individuals (from the Framingham Heart Study)." Am J Cardiol **108**(9): 1341-5.
- Furuta, A., N. Ishii, et al. (1991). "Medullary arteries in aging and dementia." Stroke **22**(4): 442-6.

d

-
- Garcia-Berrocoso, T., I. Fernandez-Cadenas, et al. (2010). "Blood biomarkers in cardioembolic stroke." Curr Cardiol Rev **6**(3): 194-201.
- Garg, P. K., R. L. McClelland, et al. (2015). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of incident cardiovascular disease in a multi-ethnic cohort: The multi ethnic study of atherosclerosis." Atherosclerosis **241**(1): 176-82.
- Gomis, M., T. Sobrino, et al. (2009). "Plasma beta-amyloid 1-40 is associated with the diffuse small vessel disease subtype." Stroke **40**(10): 3197-201.
- Gottesman, R. F., C. Cumiskey, et al. (2009). "Hemostatic factors and subclinical brain infarction in a community-based sample: the ARIC study." Cerebrovasc Dis **28**(6): 589-94.
- Gregson, J., H. A. Stirnadel-Farrant, et al. (2012). "Variation of lipoprotein associated phospholipase A2 across demographic characteristics and cardiovascular risk factors: a systematic review of the literature." Atherosclerosis **225**(1): 11-21.

h

-
- Han, J. H., K. S. Wong, et al. (2009). "Plasma level of sICAM-1 is associated with the extent of white matter lesion among asymptomatic elderly subjects." Clin Neurol Neurosurg **111**(10): 847-51.
- Hassan, A., B. J. Hunt, et al. (2003). "Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis." Brain **126**(Pt 2): 424-32.
- Hassan, A., A. Lansbury, et al. (2002). "Angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with leukoaraiosis in lacunar syndromes." J Neurol Neurosurg Psychiatry **72**(3): 343-6.
- Helenius, A. (1994). "How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **5**(3): 253-65.

- Henskens, L. H., R. J. van Oostenbrugge, et al. (2009). "Detection of silent cerebrovascular disease refines risk stratification of hypertensive patients." J Hypertens **27**(4): 846-53.
- Heo, S. H. and S. H. Lee (2010). "High levels of serum uric acid are associated with silent brain infarction." J Neurol Sci **297**(1-2): 6-10.
- Ho, L., J. C. Witteman, et al. (2009). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study." Arch Ophthalmol **127**(3): 340-1.
- Hoshi, T., K. Kitagawa, et al. (2005). "Relations of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction." Stroke **36**(4): 768-72.

i

-
- lorio, M., G. Spalletta, et al. (2013). "White matter hyperintensities segmentation: a new semi-automated method." Front Aging Neurosci **5**: 76.
- Ishikawa, J., Y. Tamura, et al. (2007). "Low-grade inflammation is a risk factor for clinical stroke events in addition to silent cerebral infarcts in Japanese older hypertensives: the Jichi Medical School ABPM Study, wave 1." Stroke **38**(3): 911-7.

j

-
- Jagust, W. J., L. Zheng, et al. (2008). "Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia." Ann Neurol **63**(1): 72-80.

k

-
- Kario, K., T. Matsuo, et al. (2001). "Hyperinsulinemia and hemostatic abnormalities are associated with silent lacunar cerebral infarcts in elderly hypertensive subjects." J Am Coll Cardiol **37**(3): 871-7.
- Kawamura, T., T. Umemura, et al. (2006). "Soluble adhesion molecules and C-reactive protein in the progression of silent cerebral infarction in patients with type 2 diabetes mellitus." Metabolism **55**(4): 461-6.
- Kawamura, T., T. Umemura, et al. (1998). "The incidence and characteristics of silent cerebral infarction in elderly diabetic patients: association with serum-soluble adhesion molecules." Diabetologia **41**(8): 911-7.
- Kearney-Schwartz, A., P. Rossignol, et al. (2009). "Vascular structure and function is correlated to cognitive performance and white matter hyperintensities in older hypertensive patients with subjective memory complaints." Stroke **40**(4): 1229-36.
- Khan, U., A. Hassan, et al. (2007). "Asymmetric dimethylarginine in cerebral small vessel disease." Stroke **38**(2): 411-3.
- Kim, B. J., S. H. Lee, et al. (2011). "Advanced coronary artery calcification and cerebral small vessel diseases in the healthy elderly." Circ J **75**(2): 451-6.
- Kim, K. W., J. R. MacFall, et al. (2008). "Classification of white matter lesions on magnetic resonance imaging in elderly persons." Biol Psychiatry **64**(4): 273-80.
- Klarenbeek, P., R. J. van Oostenbrugge, et al. (2013). "Ambulatory blood pressure in patients with lacunar stroke: association with total MRI burden of cerebral small vessel disease." Stroke **44**(11): 2995-9.
- Kleber, M. E., G. Goliash, et al. (2014). "Evolving biomarkers improve prediction of long-term mortality in patients with stable coronary artery disease: the BIO-VILCAD score." J Intern Med **276**(2): 184-94.

- Kloppenborg, R. P., M. I. Geerlings, et al. (2014). "Homocysteine and progression of generalized small-vessel disease: the SMART-MR Study." Neurology **82**(9): 777-83.
- Knezevic, A., O. Gornik, et al. (2013). "Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans." Glycobiology **20**(8): 959-69.
- Knopman, D. S., T. H. Mosley, Jr., et al. (2008). "Associations of microalbuminuria with brain atrophy and white matter hyperintensities in hypertensive sibships." J Neurol Sci **271**(1-2): 53-60.

I

-
- Linn, J. (2015). "Imaging of Cerebral Microbleeds." Clin Neuroradiol **25 Suppl 2**: 167-75.
- Liu, X. E., L. Desmyter, et al. (2007). "N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus." Hepatology **46**(5): 1426-35.
- Lyall, D. M., S. Munoz Maniega, et al. (2015). "APOE/TOMM40 genetic loci, white matter hyperintensities, and cerebral microbleeds." Int J Stroke.

m

-
- Maiolino, G., V. Bisogni, et al. (2015). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 prognostic role in atherosclerotic complications." World J Cardiol **7**(10): 609-20.
- Mancia, G., G. De Backer, et al. (2007). "2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)." Eur Heart J **28**(12): 1462-536.
- Mantyla, R., T. Erkinjuntti, et al. (1997). "Variable agreement between visual rating scales for white matter hyperintensities on MRI. Comparison of 13 rating scales in a poststroke cohort." Stroke **28**(8): 1614-23.
- Markus, H. S., B. Hunt, et al. (2005). "Markers of endothelial and hemostatic activation and progression of cerebral white matter hyperintensities: longitudinal results of the Austrian Stroke Prevention Study." Stroke **36**(7): 1410-4.
- Marrugat, J., I. Subirana, et al. (2007). "Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study." J Epidemiol Community Health **61**(1): 40-7.
- Marsland, A. L., P. J. Gianaros, et al. (2008). "Interleukin-6 covaries inversely with hippocampal grey matter volume in middle-aged adults." Biol Psychiatry **64**(6): 484-90.
- Martí-Vilalta, J. (2004). "Enfermedades vasculares cerebrales." Barcelona. Prous Science.
- Massot, A., D. Pelegri, et al. (2011). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease." Atherosclerosis **218**(1): 181-7.
- Matsui, T., H. Arai, et al. (2001). "Elevated plasma homocysteine levels and risk of silent brain infarction in elderly people." Stroke **32**(5): 1116-9.
- Medrano Martorell, S., M. Cuadrado Blazquez, et al. (2012). "[Hyperintense punctiform images in the white matter: a diagnostic approach]." Radiologia **54**(4): 321-35.
- Meschia, J. F., C. Bushnell, et al. (2014). "Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **45**(12): 3754-832.
- Minoguchi, K., T. Yokoe, et al. (2007). "Silent brain infarction and platelet activation in obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **175**(6): 612-7.

- Miwa, K., M. Tanaka, et al. (2013). "Association between interleukin-6 levels and first-ever cerebrovascular events in patients with vascular risk factors." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(2): 400-5.
- Montaner, J., M. Mendioroz, et al. (2010). "A panel of biomarkers including caspase-3 and D-dimer may differentiate acute stroke from stroke-mimicking conditions in the emergency department." J Intern Med **270**(2): 166-74.

n

Nadrowski, P., J. Chudek, et al. (2013). "Plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in elderly population in Poland--the PolSenior Study." Exp Gerontol **48**(9): 852-7.

Nagai, K., K. Kozaki, et al. (2011). "Relationship between interleukin-6 and cerebral deep white matter and periventricular hyperintensity in elderly women." Geriatr Gerontol Int **11**(3): 328-32.

o

Oncel, C., S. Demir, et al. (2009). "Association between cholesterols, homocysteine and silent brain infarcts." Intern Med J **39**(3): 150-5.

p

Paget, V., L. Legedz, et al. (2011). "N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a powerful predictor of mortality in hypertension." Hypertension **57**(4): 702-9.

Pantoni, L. (2010). "Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges." Lancet Neurol **9**(7): 689-701.

Pares-Badell, O., G. Barbaglia, et al. (2014). "Cost of disorders of the brain in Spain." PLoS One **9**(8): e105471.

Park, S. Y., S. A. An, et al. (2013). "Different impact of hyperhomocysteinemia on cerebral small vessel ischemia and cervico-cerebral atherosclerosis in non-stroke individuals." Thromb Res **131**(1): e12-6.

Paternoster, L., W. Chen, et al. (2009). "Genetic determinants of white matter hyperintensities on brain scans: a systematic assessment of 19 candidate gene polymorphisms in 46 studies in 19,000 subjects." Stroke **40**(6): 2020-6.

Pavlovic, A. M., T. Pekmezovic, et al. (2011). "Increased total homocysteine level is associated with clinical status and severity of white matter changes in symptomatic patients with subcortical small vessel disease." Clin Neurol Neurosurg **113**(9): 711-5.

Pencina, M. J., R. B. D'Agostino, Sr., et al. (2008). "Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond." Stat Med **27**(2): 157-72; discussion 207-12.

Persson, M., B. Hedblad, et al. (2007). "Elevated Lp-PLA2 levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1411-6.

Pikula, A., A. S. Beiser, et al. (2012). "Multiple biomarkers and risk of clinical and subclinical vascular brain injury: the Framingham Offspring Study." Circulation **125**(17): 2100-7.

Pikula, A., R. H. Boger, et al. (2009). "Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham offspring study." Stroke **40**(9): 2959-64.

- Pistoia, F., S. Sacco, et al. (2015). "Hypertension and Stroke: Epidemiological Aspects and Clinical Evaluation." High Blood Press Cardiovasc Prev.
- Potter, G. M., F. N. Doubal, et al. (2013). "Enlarged perivascular spaces and cerebral small vessel disease." Int J Stroke **10**(3): 376-81.
- Pradhan, A. D., J. E. Manson, et al. (2001). "C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus." JAMA **286**(3): 327-34.
- Pries, A. R. and T. W. Secomb (2002). "Structural adaptation of microvascular networks and development of hypertension." Microcirculation **9**(4): 305-14.

r

- Ravera, M., E. Ratto, et al. (2002). "Microalbuminuria and subclinical cerebrovascular damage in essential hypertension." J Nephrol **15**(5): 519-24.
- Raz, N., Y. Yang, et al. (2012). "Volume of white matter hyperintensities in healthy adults: contribution of age, vascular risk factors, and inflammation-related genetic variants." Biochim Biophys Acta **1822**(3): 361-9.
- Reinhard, H., E. Garde, et al. (2012). "Plasma NT-proBNP and white matter hyperintensities in type 2 diabetic patients." Cardiovasc Diabetol **11**: 119.
- Riba-Llena, I., A. Penalba, et al. (2014). "Role of lipoprotein-associated phospholipase A activity for the prediction of silent brain infarcts in women." Atherosclerosis **237**(2): 811-815.
- Ridker, P. M. (2001). "High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease." Circulation **103**(13): 1813-8.
- Roberts, E., A. J. Ludman, et al. (2015). "The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting." Bmj **350**: h910.
- Roberts, T. P. and D. Mikulis (2007). "Neuro MR: principles." J Magn Reson Imaging **26**(4): 823-37.
- Rost, N. S., R. M. Rahman, et al. (2010). "White matter hyperintensity volume is increased in small vessel stroke subtypes." Neurology **75**(19): 1670-7.
- Rouhl RP, D. J., Lodder J, Theunissen RO, Knottnerus IL, Staals J, Henskens LH, Kroon AA, de Leeuw PW, Tervaert JW, van Oostenbrugge RJ. (2012). "Vascular inflammation in cerebral small vessel disease. ." Neurobiol Aging.
- Ruhaak, L. R., H. W. Uh, et al. (2011). "Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health." J Proteome Res **10**(4): 1667-74.

s

- Sabayan, B., M. A. van Buchem, et al. (2015). "N-terminal pro-brain natriuretic peptide and abnormal brain aging: The AGES-Reykjavik Study." Neurology **85**(9): 813-20.
- Saenger, A. K., D. A. Dalenberg, et al. (2009). "Pediatric brain natriuretic peptide concentrations vary with age and sex and appear to be modulated by testosterone." Clin Chem **55**(10): 1869-75.
- Sarchielli, P., K. Nardi, et al. (2013). "Immunological profile of silent brain infarction and lacunar stroke." PLoS One **8**(7): e68428.
- Satizabal, C. L., Y. C. Zhu, et al. (2012). "Circulating IL-6 and CRP are associated with MRI findings in the elderly: the 3C-Dijon Study." Neurology **78**(10): 720-7.
- Schedin-Weiss, S., B. Winblad, et al. (2014). "The role of protein glycosylation in Alzheimer disease." Febs J **281**(1): 46-62.

- Scheltens, P., F. Barkhof, et al. (1993). "A semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging." J Neurol Sci **114**(1): 7-12.
- Schmidt, R., H. Schmidt, et al. (2006). "C-reactive protein, carotid atherosclerosis, and cerebral small-vessel disease: results of the Austrian Stroke Prevention Study." Stroke **37**(12): 2910-6.
- Seshadri, S., P. A. Wolf, et al. (2008). "Association of plasma total homocysteine levels with subclinical brain injury: cerebral volumes, white matter hyperintensity, and silent brain infarcts at volumetric magnetic resonance imaging in the Framingham Offspring Study." Arch Neurol **65**(5): 642-9.
- Sesso, H. D., J. E. Buring, et al. (2003). "C-reactive protein and the risk of developing hypertension." JAMA **290**(22): 2945-51.
- Shih, C. Y., C. Y. Chen, et al. (2012). "Relationship between serum uric acid and cerebral white matter lesions in the elderly." Nutr Metab Cardiovasc Dis **22**(2): 154-9.
- Shoamanesh, A., S. R. Preis, et al. (2015). "Inflammatory biomarkers, cerebral microbleeds, and small vessel disease: Framingham Heart Study." Neurology **84**(8): 825-32.
- Suk, S. H., R. L. Sacco, et al. (2003). "Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study." Stroke **34**(7): 1586-92.
- Sullivan, G. W., I. J. Sarembock, et al. (2000). "The role of inflammation in vascular diseases." J Leukoc Biol **67**(5): 591-602.
- Sun, W., Z. X. Huang, et al. (2014). "Relations of serum soluble E-selectin and adiponectin with enlarged perivascular spaces in patients with recent lacunar infarction." CNS Neurosci Ther **20**(4): 382-4.

t

- Testa, R., V. Vanhooren, et al. (2015). "N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters." PLoS One **10**(3): e0119983.
- Thompson, A., P. Gao, et al. (2010). "Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies." Lancet **375**(9725): 1536-44.
- Tiehuis, A. M., K. L. Vincken, et al. (2008). "Automated and visual scoring methods of cerebral white matter hyperintensities: relation with age and cognitive function." Cerebrovasc Dis **25**(1-2): 59-66.

v

- van der Horst, I. C., R. A. de Boer, et al. (2010). "Neurohormonal profile of patients with heart failure and diabetes." Neth Heart J **18**(4): 190-6.
- van Dijk, E. J., N. D. Prins, et al. (2004). "Plasma amyloid beta, apolipoprotein E, lacunar infarcts, and white matter lesions." Ann Neurol **55**(4): 570-5.
- van Dijk, E. J., N. D. Prins, et al. (2005). "C-reactive protein and cerebral small-vessel disease: the Rotterdam Scan Study." Circulation **112**(6): 900-5.
- van Sloten, T. T., S. Sigurdsson, et al. (2015). "Cerebral Small Vessel Disease and Association With Higher Incidence of Depressive Symptoms in a General Elderly Population: The AGES-Reykjavik Study." Am J Psychiatry **172**(6): 570-8.
- van Straaten, E. C., F. Fazekas, et al. (2006). "Impact of white matter hyperintensities scoring method on correlations with clinical data: the LADIS study." Stroke **37**(3): 836-40.

- Vanhooren, V., S. Dewaele, et al. (2010). "Serum N-glycan profile shift during human ageing." Exp Gerontol **45**(10): 738-43.
- Vanhooren, V., X. E. Liu, et al. (2009). "N-glycan profiles as tools in diagnosis of hepatocellular carcinoma and prediction of healthy human ageing." Mech Ageing Dev **130**(1-2): 92-7.
- Vanhooren, V., A. Navarrete Santos, et al. (2015). "Protein modification and maintenance systems as biomarkers of ageing." Mech Ageing Dev **151**: 71-84.
- Vermeer, S. E., W. T. Longstreth, Jr., et al. (2007). "Silent brain infarcts: a systematic review." Lancet Neurol **6**(7): 611-9.
- Vermeer, S. E., E. J. van Dijk, et al. (2002). "Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: The Rotterdam Scan Study." Ann Neurol **51**(3): 285-9.

w

- Wada, M., H. Nagasawa, et al. (2007). "Microalbuminuria is a risk factor for cerebral small vessel disease in community-based elderly subjects." J Neurol Sci **255**(1-2): 27-34.
- Wada, M., H. Nagasawa, et al. (2008). "Cerebral small vessel disease and C-reactive protein: results of a cross-sectional study in community-based Japanese elderly." J Neurol Sci **264**(1-2): 43-9.
- Wahlund, L. O., F. Barkhof, et al. (2001). "A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT." Stroke **32**(6): 1318-22.
- Wang, R., C. Li, et al. (2014). "Automatic segmentation and quantitative analysis of white matter hyperintensities on FLAIR images using trimmed-likelihood estimator." Acad Radiol **21**(12): 1512-23.
- Wang, T., H. Liu, et al. (2014). "RCAN1 increases A β generation by promoting N-glycosylation via oligosaccharyltransferase." Curr Alzheimer Res **11**(4): 332-9.
- Wardlaw, J. M., M. S. Dennis, et al. (2001). "Imaging appearance of the symptomatic perforating artery in patients with lacunar infarction: occlusion or other vascular pathology?" Ann Neurol **50**(2): 208-15.
- Wardlaw, J. M., K. J. Ferguson, et al. (2004). "White matter hyperintensities and rating scales-observer reliability varies with lesion load." J Neurol **251**(5): 584-90.
- Wardlaw, J. M., S. C. Lewis, et al. (2006). "Cerebral microbleeds are associated with lacunar stroke defined clinically and radiologically, independently of white matter lesions." Stroke **37**(10): 2633-6.
- Wardlaw, J. M., C. Smith, et al. (2013). "Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging." Lancet Neurol **12**(5): 483-97.
- Wardlaw, J. M., E. E. Smith, et al. (2013). "Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration." Lancet Neurol **12**(8): 822-38.
- Windham, B. G., B. Deere, et al. (2015). "Small Brain Lesions and Incident Stroke and Mortality: A Cohort Study." Ann Intern Med **163**(1): 22-31.
- Wright, C. B., Y. Moon, et al. (2009). "Inflammatory biomarkers of vascular risk as correlates of leukoariosis." Stroke **40**(11): 3466-71.

x

- Xiao, L., W. Lan, et al. (2015). "Chronic Kidney Disease in Patients With Lacunar Stroke: Association With Enlarged Perivascular Spaces and Total Magnetic Resonance Imaging Burden of Cerebral Small Vessel Disease." Stroke **46**(8): 2081-6.

y

- Yoshida, M., K. Higashi, et al. (2010). "Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP." Atherosclerosis **211**(2): 475-9.
- Yoshida, M., H. Tomitori, et al. (2009). "Acrolein, IL-6 and CRP as markers of silent brain infarction." Atherosclerosis **203**(2): 557-62.
- Yushkevich, P. A., J. Piven, et al. (2006). "User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability." Neuroimage **31**(3): 1116-28.

z

- Zhang, J. B., L. F. Liu, et al. (2015). "Associations between biomarkers of renal function with cerebral microbleeds in hypertensive patients." Am J Hypertens **28**(6): 739-45.
- Zhu, Y. C., C. Tzourio, et al. (2010). "Severity of dilated Virchow-Robin spaces is associated with age, blood pressure, and MRI markers of small vessel disease: a population-based study." Stroke **41**(11): 2483-90.

Anexos 9

Anexo I

Blood and CSF biomarkers in brain subcortical ischemic vascular disease: involved pathways and clinical applicability
J Cereb Blood Flow Metab. 2015 Apr 22

REVIEW ARTICLE

Blood and CSF biomarkers in brain subcortical ischemic vascular disease: involved pathways and clinical applicability

A Vilar-Bergua¹, I Riba-Llena¹, C Nafria¹, A Bustamante¹, V Llombart¹, P Delgado^{1,3} and J Montaner^{1,2,3}

Vascular dementia is the second most common type of dementia after Alzheimer's disease (AD). Subcortical ischemic vascular disease refers to a form of vascular cognitive impairment characterized by the presence of diffuse white matter hyperintensities (WMHs) and multiple lacunar infarcts. These neuroimaging findings are mainly caused by cerebral small-vessel disease (cSVD) and relate to aging and cognitive impairment, but they can also be silent and highly prevalent in otherwise healthy individuals. We aimed to review studies on blood and cerebrospinal fluid (CSF) markers related to the presence of WMHs and lacunar infarcts that have been conducted in the past in large population-based studies and in high-risk selected patients (such as those with vascular risk factors, vascular cognitive impairment, or AD). Relevant associations with the presence and progression of cSVD have been described in the blood for markers related to inflammatory processes, endothelial damage and coagulation/fibrinolysis processes, etc. Also, different combinations of CSF markers might help to differentiate between etiologic types of dementia. In the future, to translate these findings into clinical practice and use biomarkers to early diagnosis and monitoring vascular cognitive impairment would require the replication of candidate markers in large-scale, multicenter, and prospectively designed studies.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism advance online publication, 22 April 2015; doi:10.1038/jcbfm.2015.68

Keywords: brain ischemia; cerebrospinal fluid; cerebrovascular diseases; vascular cognitive impairment; white matter disease

INTRODUCTION

Subcortical Ischemic Vascular Disease

Vascular cognitive impairment comprise a wide spectrum of cognitive dysfunctions that range from subtle or even clinically undetected (silent or covert) changes to the presence of an established dementia. Subcortical ischemic vascular disease (SIVD) is a term that encompasses a subtype of vascular cognitive impairment characterized by the presence of extensive white matter hyperintensities (WMHs) and multiple lacunar infarcts in brain imaging.¹ Although these brain lesions might be related to several etiologies, they are predominantly caused by cerebral small-vessel disease (cSVD).²

Apart from lacunar infarcts and WMHs, brain atrophy and the presence of visible Virchow-Robin spaces (VRSs) are other common radiologic features of cSVD.³ Although their relationship to vascular cognitive impairment is not as well established as it is for lacunar infarctions or WMHs, they will be probably considered among that spectrum in the coming years. Finally, hemorrhagic manifestations of cSVD such as cerebral microbleeds or superficial siderosis are out of the focus of this review.

Subcortical ischemic vascular disease is a progressive condition that evolves from normal cognitive status to established dementia, and its clinical and imaging characteristics partially overlap with other dementias. Therefore, SIVD biomarkers should provide a tool for an early detection, prediction of clinical course,

differentiation from other dementias, and even to monitor response to specific treatments.⁴

Research on biomarkers in the past has been mainly focused to relate candidate markers to specific neuroimaging cSVD features (mainly lacunar infarcts and WMHs) in several population-based studies or in selected, high-risk participants, such as those with vascular risk factors.^{2,5,6} Other studies were designed to compare candidate biomarkers among different types of vascular cognitive impairment groups (i.e., SIVD versus mixed dementia) or even to show differences from Alzheimer's disease (AD) participants at different stages (mild cognitive impairment (MCI), mild to moderate dementia, etc.) or from healthy subjects. The majority of studies were conducted on blood proteins, although here we will review human studies on both blood and cerebrospinal fluid (CSF) biologic markers (not only proteins but also mRNA, genes, peptides, protein fragments, and lipids). Finally, both cross-sectional and longitudinal associations between biomarkers and imaging cSVD markers will be described, since in the past few years, information on accumulation of WMHs and incident lacunar infarcts in serial magnetic resonance imaging (MRI) examinations have become available.

Imaging Features of Cerebral Small-Vessel Disease and Subcortical Ischemic Vascular Disease

Silent brain infarcts (SBIs) are small brain ischemic lesions, which occur without a corresponding stroke-like event. They can be

¹Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and ²Neurology Department, Stroke Unit, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr J Montaner, Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. E-mail: 31862jmv@comb.cat

This research was funded with grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI10/0705, CM10/00063, and CP09/136), from the Catalan Society of Hypertension, the Càtedra-UAB Novartis de Medicina de Família and IDIAP Jordi Gol, and from the Fundació Josep Palau Francàs. Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005).

³PD and JM contributed equally to this work and share senior authorship

Received 12 January 2015; revised 20 March 2015; accepted 21 March 2015

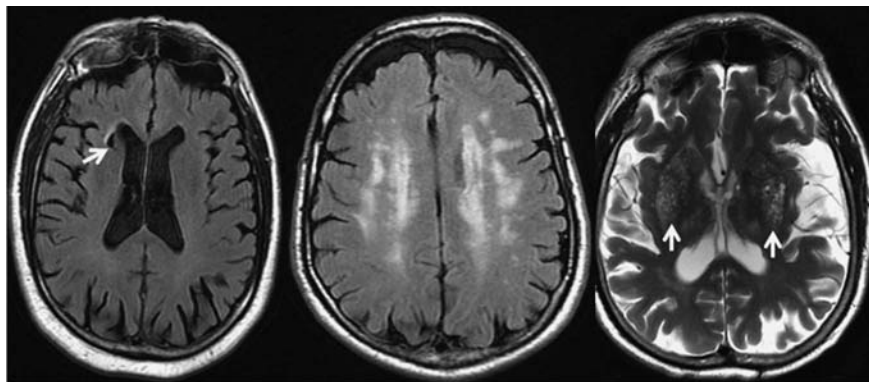


Figure 1. Representative examples of imaging markers of cerebral small-vessel disease. From left to right: brain infarct affecting caudate nuclei is shown by a white arrow (fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) magnetic resonance imaging (MRI)), extensive white matter changes (FLAIR MRI), and enlarged perivascular spaces involving basal ganglia shown by white arrows and moderate temporooccipital brain atrophy (T2 MRI); 1.5 Tesla MR (Signa HDx 1.5, General Electric, Waukesha, WI, USA).

found in 8% to 28% of healthy subjects and their prevalence increase with age and hypertension. The great majority of SBI are indeed lacunar infarcts, since >90% of them are small infarcts found in the subcortical white matter, basal ganglia, thalamus, and infratentorial region, and usually they are caused by cSVD.^{7,8} Although many variations have been reported in the past regarding their diagnostic criteria concerning aspects such as size, CSF signal characteristics, or the presence of peripheral gliosis or degree of cavitation, they are usually defined in MRI as lesions thought to be of vascular origin, with CSF-like intensity signal in all pulse sequences, and with a maximum diameter comprised between 3 and 20 mm.⁹

White matter lesions appear at MRI as focal or confluent, hyperintense lesions on brain T2-weighted sequences that are located in the deep subcortical white matter or in periventricular areas.¹⁰ These WMHs also increase steadily with age and are found more often in subjects with vascular risk factors, such as hypertension or diabetes.^{11,12} In these conditions, arteriosclerosis (vessel wall thickening and luminal narrowing) leads to restriction of cerebral blood flow and intermittent lack of oxygen supply, which triggers a series of events such as neuroinflammation and blood-brain barrier disruption.^{13,14} It has been recently shown that newly appearing focal WMHs display the signature features of acute ischemic stroke on brain MRI (restricted water diffusion on diffusion-weighted images), although with time, the characteristics of these lesions evolve and appear similar to those of areas with preexisting WMHs.¹⁵

Visible VRSs are described as dilated spaces with accumulation of interstitial fluid, which surrounds small, deep, perforating arterioles as they go through deep gray and white matter. They are visible on T2- and T1-weighted MRI sequences and share signal characteristics with CSF. Virchow-Robin spaces have been described as a constant feature in pathologic studies of cSVD.¹⁶ Virchow-Robin spaces are also present in general populations and their prevalence increases with age, hypertension, and with the presence of other markers of cSVD.¹⁷

Brain atrophy is characterized by the loss of neuronal cells and brain parenchyma, with resulting increase in the volume of ventricles and sulci. Increased brain atrophy has been described in elderly healthy people, but an abnormal grade has been used as an outcome measure in AD, cSVD studies, and other neurologic disorders.^{18,19} Representative examples of these common MRI features are shown in Figure 1.

Blood Biomarkers Associated with Imaging Features of Cerebral Small-Vessel Disease and Subcortical Ischemic Vascular Disease
A biomarker is 'a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes,

pathogenic processes or pharmacologic responses to intervention' according to the National Institutes of Health Definitions Working Group.²⁰ Several families of candidate biomarkers have been studied so far in relation to SIVD. We will focus in this review on biomarkers related to inflammation, endothelial dysfunction, hemostasis, and components of the renin-angiotensin-aldosterone system, among others.

Inflammatory biomarkers. Inflammation has been recognized as a key component in cerebrovascular and neurodegenerative diseases.^{21,22} Inflammation might contribute to SIVD through several processes such as atherogenesis, low-grade inflammation, and platelet aggregation, which are mediated by cytokines, leukocyte adhesion molecules, chemokines, growth factors, and also lipids.²¹

C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) are the most commonly studied inflammatory biomarkers in this field. C-reactive protein, an acute-phase reactant synthesized in the liver in response to IL-6, has been widely used as a vascular inflammatory marker. It has been associated with the pathogenesis of atherosclerosis, development of diabetes, hypertension, metabolic syndrome, and with the appearance of cardiovascular events.²³⁻²⁶ Interleukin-6 is secreted by T cells and macrophages to stimulate immune response and by smooth muscle cells of blood vessels as a proinflammatory cytokine. It is associated with myocardial infarction, stroke, cardiovascular death, and peripheral arterial disease.^{26,27}

Several studies focused on the analysis of inflammatory markers in the context of SBI in general populations. High levels of IL-6 and CRP were found associated with the risk of SBIs in one study, and confirmed by other, in which it was shown that the combination of Acrolein, CRP, and IL-6 was associated with the risk of both SBIs and WMHs.²⁸⁻³⁰

However, some studies have also reported negative associations. C-reactive protein and IL-6 levels were analyzed in a large study and only a cross-sectional association of IL-6 with WMHs was found. Neither SBIs incidence nor WMH progression at follow-up were associated with IL-6 or CRP, although small rates of progression might have limited statistical power to show associations.³¹

On selected populations at higher risk for SIVD, such as those with vascular risk factors (diabetes and hypertension) or other clinical conditions such as kidney failure, IL-6 and CRP were similarly associated with SBIs as in population-based studies.³²⁻³⁴ Given the close relationship between SBIs and the risk of future clinical stroke and cognitive decline, these inflammatory markers might prove potentially useful predictors of outcome in specific populations.

Table 1. Circulating blood biomarkers associated with silent brain infarctions and WMHs ordered by relevance according to number of patients recruited in the studies

Name	Reference number	Total N ^a	Silent brain infarcts		WMHs	
			Studies identifying +association ^b	Studies identifying no association	Studies identifying +association	Studies identifying no association
CRP	P02741	9,899	28–30,32,33	31,50,73,77,117	10,31,35,36	38–41,73
IL-6	P05231	5,803	14,27–30,32	35,42	35,39	41,42
HCY	CID91552	5,399	57,117–120	73	10,59–61,118,120	57,73
UACR	ALBU: P02768, creatinine: CID 588	4,803	70,71,121	73	70,72	73
ADMA	CID123831	3,272	65		60	
Amyloid β (1-40)	CID57339250	3,012	67,68		67,68	66
Amyloid β (1-42)	CID57339251	1,839		67		69
ICAM1	P05362	963	49,50,122		40,54,55	53
E-selectin	P16581	721		40,50,122	52	40
VCAM1	P19320	495	40	50	40,56	
P-selectin	P16109	440	123	40	56	40

Abbreviations: ADMA, asymmetric dimethylarginine; CRP, C-reactive protein; E-selectin, LYAM2; HCY, homocysteine; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; IL-6, interleukin-6; P-selectin, LYAM3; SBIs, silent brain infarcts; UACR, urine albumin to creatinine ratio; VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1; WMHs, white matter hyperintensities. Biomarker names and reference numbers are obtained from official name from UniProt, PubChem, and RCSB databases. ^aSample size is the sum of patients included in studies. ^bAlmost all associations of biomarkers with SBIs or WMHs are positive (+) high levels of biomarkers associated with high prevalence, number, and progression except few that are negative (–) indicating a protective association (high levels of biomarkers associated with low prevalence, number, and progression).

Regarding WMHs, increased plasma levels of CRP have been linked to their presence and progression in some studies, while in others the association was not found.^{10,31,35–40}

Other typical features of cSVD and SIVD, such as the presence of brain atrophy and VRS have also been related with inflammatory biomarkers. The association between CRP, IL-6, and fibrinogen with visible VRSs and WMHs was examined in the Lothian Birth Cohort 1936. A weak association was found between inflammatory markers and visible VRS, which was not present between inflammatory markers and WMHs.⁴¹ Other authors assessed the association between plasmatin neopterin (a molecule expressed by activated monocytes) and VRSs. Neopterin levels were found linearly associated with the amount of VRSs at the basal ganglia.⁴⁰ Both studies suggest that inflammation might play a role in the enlargement of perivascular spaces, as it happens with other diseases such as multiple sclerosis, in which the inflammatory activity coincides with the dilation of perivascular spaces.

Regarding brain atrophy, IL-6 has been associated with severe cortical atrophy, and decreased gray matter or hippocampal volumes in cross-sectional studies of candidate biomarkers,^{31,42} and also in studies using panels of multiple biomarkers.^{43,44}

Finally, it needs to be mentioned that interactions between inflammatory biomarkers and age, gender, and ethnicity might exist. As an example, Japanese populations were suggested to have lower CRP levels and weaker associations with WMHs than those seen in western populations.⁴⁵ Likewise, gender differences had also been proposed, with higher prevalence and greater progression of WMHs in women than in men, and a stronger association between IL-6 and WMHs in women than in men.^{39,46,47}

In summary, CRP and IL-6 are probably the most extensively studied inflammatory biomarkers in relation to cSVD presence and progression, although results are not consistent among all populations (Table 1). Other less studied inflammatory biomarkers and their relation with SBIs or WMHs are shown in Supplementary Table 1.

Endothelial dysfunction. The healthy endothelium plays a pivotal role in regulating brain vascular homeostasis and many factors may alter this and converge to generate endothelial dysfunction.

Endothelial dysfunction appears as a result of persistent ischemia/reperfusion and inflammation generating oxidative stress from unbalanced free radical formation that leads to peroxynitrite formation, lipid peroxidation, protein modification, matrix metalloproteinase (MMP) activation, and DNA damage. All these combined with the previously covered proinflammatory stimuli (chemokines, cytokines, and adhesion molecules that interact with leukocytes and platelets), and enhanced by the concurrence of vascular risk factors promotes that the endothelium becomes dysfunctional, blood–brain barrier permeability is disrupted allowing infiltration of the brain parenchyma with circulating toxic molecules and prothrombotic changes may occur.⁴⁸

A panel of 24 analytes including cytokines, chemokines, growth factors, adhesion molecules, cell surface receptors, and inducers of apoptosis was tested in a small group of subjects ($N=21$) with SBIs and also in patients with a first-ever lacunar infarction and healthy controls. They found the chemokine monokine induced by gamma interferon, intercellular adhesion molecule 1, and stem cell factor as the best predictors for SBIs and measured their discriminative capacity by the area under the curve (values of 0.84, 0.81, and 0.73, respectively) over healthy controls. Despite the small sample size and the lack of age-matched controls, they suggested a specific immune-mediated profile for SBIs, which merits further replication.⁴⁹

Besides, endothelial damage markers have also been involved not only in the presence but also in the progression of SBIs over time, and in fact they might be predictive in diabetic populations.^{50,51}

White matter hyperintensities have also been related to higher levels of several endothelial dysfunction markers like soluble E-selectin, soluble intercellular adhesion molecule 1, soluble P-selectin, and soluble vascular cell adhesion molecule 1 in cross-sectional studies.^{52–56} Moreover, both baseline WMH load and intercellular adhesion molecule 1 were independent predictors of WMH progression after adjustment by potential confounders in a longitudinal assessment of the community-based Austrian Stroke Prevention study.⁵⁵

Homocysteine (HCY) is a product of the metabolism of dietary methionine. The liver is the major site of HCY metabolism, with

kidney also making a significant contribution. Elevated levels of HCY can result from a variety of causes although folate deficiency appears to be a major determinant of fasting HCY levels in otherwise healthy individuals as well as in patients with kidney failure.

The mechanisms underlying the association between HCY with brain vascular disease are not completely understood but may involve both vascular and neuronal pathways.

Homocysteine levels were measured within a middle-aged cohort from the Framingham Offspring study, a strong association was found between higher plasma HCY levels and lower total cerebral brain volume and with an increased risk of SBI, whereas no relation was found with WMH volumes.⁵⁷ Similar associations were obtained in the Rotterdam Scan study, where a continuous and graded association of HCY was found with SBIs, although HCY levels were also higher in those with more WMHs.²

Both types of lesions were combined in a study, to define a diffuse cSVD subtype (presence of both lacunar infarction and WMHs) and a focal subtype (isolated lacunar infarction). Homocysteine was described as a stronger predictor for the diffuse than for the focal subtype. Also, other markers of endothelial dysfunction, such as intercellular adhesion molecule 1 and thrombomodulin, could improve the prediction of these lesions together with HCY.⁵⁸

More recently, HCY levels appeared also associated with progression of WMHs in a cohort with symptomatic atherosclerotic disease from the SMART-MR study (Second Manifestations of Arterial Disease-Magnetic Resonance study).⁵⁹

Homocysteine positive association with the presence of WMHs is also well documented with symptomatic cSVD patients, such as those having a transient ischemic attack (TIA) or subcortical stroke, where it is not only associated with MRI lesions but also with cognitive status.^{60,61} Since cognitive impairment has been associated with hyperhomocysteinemia, several studies have investigated whether vitamin supplementation to reduce HCY levels would also delay cognitive decline. Results obtained to date either in healthy elderly individuals or in those with prior stroke or TIA do not confirm the efficacy of this treatment to prevent cognitive decline.^{62–64}

Asymmetric dimethylarginine is an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Abnormally high asymmetric dimethylarginine levels reflect the presence of endothelial dysfunction and they are also related to hyperhomocysteinemia. Higher levels of asymmetric dimethylarginine were described in 47 symptomatic cSVD patients as compared with healthy controls, which were also correlated with WMH severity, but not with the number of lacunar infarcts.⁶⁰ Meanwhile, in stroke-free subjects from the Framingham Offspring cohort, baseline plasma asymmetric dimethylarginine levels were predictive of the risk of SBIs (assessed 4 years later) but not for large WMHs.⁶⁵

Amyloid peptides (A β 1-40 and A β 1-42 species) are generated by amyloid precursor protein cleavage. They are able to aggregate into fibrillar deposits both in brain tissue (plaques) and in vessel walls. Several studies have suggested a toxic effect on the vessel wall of the A β 1-40.

An association of A β 1-40 but not A β 1-42 with WMHs and lacunar infarcts was described in a heterogeneous population composed of AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy patients.⁶⁶ Likewise, others described A β 1-40 levels strongly associated with diffuse cSVD (defined as the presence of multiple lacunes and WMHs) in a cohort of acute lacunar stroke.⁶⁷

Besides, studies of amyloid β peptides on healthy individuals have provided mixed results. Authors from the Rotterdam Scan study reported a strong association between both elevated peptides and SBIs or extensive WMHs in apolipoprotein E4 carriers.⁶⁸ On the contrary, no cross-sectional associations were found with WMHs or lacunes in the Three-City Dijon study but instead, low levels of both species were associated with WMH

progression after 4 years of follow-up.⁶⁹ Further research in larger populations is needed to determine how A β deposition in the brain affects plasma and CSF levels of peptides. High circulating levels could mean a damaged neurovascular unit as a consequence of ischemic microvascular disease and WMHs. However, low circulating levels would reflect deposition on vessel wall, as it has been described in cerebral amyloid angiopathy, and further cerebrovascular damage.

Microalbuminuria, assessed by means of urinary albumin to creatinine ratio might reflect early kidney damage or systemic endothelial dysfunction.

Microalbuminuria was found as an independent risk factor for SBI and moderate WMHs in a community-based study on elderly Japanese participants.⁷⁰ Similar findings were described for SBIs, and for WMHs or brain atrophy in hypertensive populations.^{71,72} All of them support the idea of microalbuminuria as an early marker of preclinical brain damage in essential hypertension, and suggest its potential usefulness to identify high-risk patients, which might be candidates for preventive approaches.

Finally, microalbuminuria was also found to be a risk factor for decreased total cerebral brain volume in the Framingham Offspring study.⁷³

A summary of the most relevant biomarkers associated with endothelial function is shown in Table 1.

Hemostatic abnormalities. Molecules involved in the coagulation and fibrinolytic pathways have been largely studied in symptomatic cardiovascular and cerebrovascular disease. Tissue factor, coagulation factor VII, or thrombomodulin are among the most investigated players, and it is well known that a prothrombotic status is associated with cardiovascular risk.⁷⁴ However, less is known about the role of hemostatic biomarkers in SIVD with most of the studies yielding discordant evidences (Supplementary Table 1).

Thrombomodulin has been associated with the presence and number of lacunar infarctions and also with WMHs, especially in the presence of microalbuminuria.^{53,70,75} Plasminogen activator inhibitor-1 is one of the main inhibitors of fibrinolysis, acting on tissue plasminogen activator and urokinase. Results on the relationship between plasminogen activator inhibitor-1 levels and SBI or WMHs are conflicting and the same could be argued for fibrinogen or D-dimer (a marker of fibrinolytic turnover).

A small study described that the levels of thrombin-antithrombin complex and cross-linked D-dimer were higher in a group of patients with subcortical vascular dementia and severe leukoariosis (Binswanger's disease) at deteriorating states as compared with patients with other neurologic diseases.⁷⁶

Finally, von Willebrand factor, a glycoprotein expressed by endothelial cells after tissue damage, showed more consistent results. High plasma von Willebrand factor levels were associated with the presence, and number of SBI, with periventricular but not deep WMHs, and with WMH burden.^{77–80}

Renin-angiotensin-aldosterone system. The components of the renin-angiotensin-aldosterone system have been studied as candidate markers in cSVD because of their role in hypertension, endothelial function, and the regulation of smooth muscle cell proliferation and tone.⁸¹ Specifically, results with angiotensinogen, angiotensin, angiotensin converting enzyme (ACE), and angiotensin II receptor type 1 have been reported. Although most of the studies refer to single nucleotide polymorphisms, few have evaluated protein levels (or protein activity) involved in this pathway (Supplementary Table 1).

Angiotensin converting enzyme levels were investigated in a cross-sectional study of 510 subjects, the Genetique de l'Infarctus Cerebral study. These authors found an association between plasma ACE levels and the presence of multiple lacunar infarctions, but not with WMHs.⁸² Later on, increased ACE levels

have been found in those subjects with greater progression of deep WMH volume but with less progression of cortical atrophy, suggesting a dual role (beneficial/detrimental) of ACE in the brain.⁸³

Extracellular matrix proteins. Matrix metalloproteinases are a family of zinc- and calcium-dependent endopeptidases secreted as proenzymes by several cell types as neurons and glial cells.⁸⁴ Matrix metalloproteinases act cleaving almost all matrix proteins, and this process is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinases. Besides matrix proteins, they can process cytokines and neuronal structural proteins such as myelin basic protein or tight junction proteins. A role for this family of proteases has been suggested in postmortem studies of vascular dementia, including subjects with Binswanger's disease.⁸⁵ Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 plasma levels were found to be associated with WMHs and brain atrophy in a study within 583 participants of the Framingham Offspring study.⁸⁶

Lipid metabolism. The diagnostic value of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides is not well established for cSVD. In the Leukoaraiosis And DISability (LADIS) study, progression over time of cSVD markers were analyzed and the authors described protective associations of low-density lipoprotein and triglycerides with lacunes and WMH progression, respectively.⁸⁷

In contrast, in a study of two independent cohorts, comprising a total of 2,608 elderly participants, several lipid fractions (triglycerides, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein) were analyzed, and it was shown that increasing triglyceride levels were associated with increasing frequency and severity of lacunes and WMH volume. These findings were similar considering those subjects taking or not taking lipid-lowering drugs.⁸⁸

However, other authors tested a similar lipid profile and found no association between lipids and WMH volumes or SBIs for their whole population. Nevertheless some associations emerged between lipids and WMHs in APOE4 carriers or in those presenting worsening total cholesterol or high-density lipoprotein cholesterol over time.⁸⁹

Lipoprotein-associated phospholipase A₂ is an hydrolase enzyme produced by inflammatory cells that circulates mainly to bound low-density lipoproteins and less frequently with high-density lipoproteins.⁹⁰ Its use was approved by the FDA (Food and Drug Administration) for cardiovascular risk prediction. Its proinflammatory activity is supported by a number of epidemiologic studies suggesting that plasmatic lipoprotein-associated phospholipase A₂ is an independent predictor of cardiovascular events. Our group analyzed lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity in a population of middle aged to elderly hypertensives and an association between this enzyme and SBIs was found in women, but not in men.⁹ Lipoprotein-associated phospholipase A₂ mass and myeloperoxidase were found to be associated with WMH volumes, but not with brain infarcts in another study in which no interactions with gender were noticed.³⁸

Lipoprotein-associated phospholipase A₂ mass and activity have also been described as a risk factor for dementia in the Cardiovascular Health Study. Regarding subtypes, lipoprotein-associated phospholipase A₂ mass has been mainly related to AD subtype, while the enzyme activity was a risk factor for vascular dementia.⁹¹

A summary of lipid metabolism molecules associated with SBIs and WMHs are shown in Supplementary Table 1.

Other blood biomarkers. In this section, we will consider other markers from which evidence is less strong or cannot be included in any of the families already presented here (Supplementary Table 1).

Highly sensitive cardiac troponin T and B-type natriuretic peptide are considered biomarkers of subclinical cardiac injury.

Within the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study, both were analyzed and found to be related to the presence of SBIs and WMHs, and also with their incidence and progression, respectively.⁹² However, in the Framingham Offspring cohort, investigators failed to find any association for B-type natriuretic peptide and SBIs or WMHs (taken B-type natriuretic peptide either as a part of a panel composed by eight different biomarkers or alone). Interestingly though, the full panel of biomarkers (which comprised molecules of inflammation, hemostasis, neurohormonal activity, and endothelial function) was associated with total cerebral brain volume.⁷³

Increased levels of uric acid are associated with elevated serum triglyceride, cholesterol, and blood glucose levels and with metabolic syndrome. Some reports have shown beneficial effects in acute stroke animal models and there is a clinical trial on neuroprotective effects of uric acid on stroke patients. Nevertheless, the relationship between uric acid and subclinical brain vascular disease remains unclear. Although one study found high levels of uric acid independently related to the presence of SBIs only in women, others found uric acid as a risk factor for WMHs only in men.^{93,94}

Oxidative processes on lipids and carbohydrates lead to the formation of reactive carbonyl species that transforms proteins on advanced glycation end products. The activation of the receptor of advanced glycation end product induces proinflammatory cytokines and free radicals that also activate the receptor, thereby enhancing endothelial damage. Soluble receptor of advanced glycation end product levels were found to differ according to gender in the Northern Manhattan Study and were also inversely related with the risk of SBIs, particularly in Hispanics and non-Hispanic blacks.⁹⁵

Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Subcortical Ischemic Vascular Disease

The release of cellular products and molecules into the extracellular space because of degeneration or acute damage should be reflected in the biochemical composition of the CSF. However, in contrast to blood biomarkers, few studies have been conducted to assess biomarkers of SIVD or their related MRI markers using CSF samples.

It has been described that levels of sulfatides, increased levels of myelin basic protein and neurofilament light polypeptide might be associated with some features of cSVD, in particular with WMHs.^{96–99}

Neurofilaments are part of the axonal structure and play a role on transport within the neuron. Neurofilament light polypeptide is the most abundant of the three filament proteins (heavy, medium, and light) that compose the neurofilaments. Neurofilament light polypeptide increase in CSF might be a consequence of axonal damage. Neurofilament light polypeptide was found to be increased in dementia-free patients in relation to increasing WMHs in a cross-sectional analysis from the LADIS study, in AD and in SIVD subjects, and also in MCI patients that later on developed subcortical vascular dementia.^{15,96,100} The later study showed that CSF levels of A β 1-42, total Tau (t-Tau), and Phospho-Tau (P-Tau) distinguished between those MCI patients evolving to AD as compared with those who progress to SIVD.

Blood–brain barrier dysfunction as indicated by an increased albumin CSF/serum ratio has been related to WMHs in previous studies on patients with dementia.¹⁰¹ Furthermore, MMP-2 and MMP-9 in CSF and plasma (in reference to CSF and plasma albumin) and MMP-3 activity were measured in a cohort of 60 patients with vascular cognitive impairment—no dementia. Matrix metalloproteinase-2 ratio was found to be significantly lowered in the whole group of vascular cognitive impairment subjects as compared with controls and also negatively correlated with the albumin ratio. Furthermore, the combination between MMP-2

Table 2. Usefulness of cerebrospinal fluid biomarkers on discriminating dementia types

Name	Reference number	VaD > AD	VaD < AD	VaD > healthy control	VaD < healthy control	No significant differences
NFL	P07196	98–100		98–100		
MBP	P02686	98		98		
TAU	P10636		98,100	98		
A β 1-42	CID57339251	98		100	98	100
Albumin (CSF/serum)	P02768			100		123
MMP-3 activity	P08254			102		98
MMP-2 (CSF/serum)	P08253				98	98
MMP-9	P14780	98		98		102
TIMP1	P01033	98		98		
HFABP	P05413			98		

AD, Alzheimer's disease; A β 1-42, amyloid β (1-42) peptide; CSF, cerebrospinal fluid; HFABP, heart fatty acid binding protein; MBP, myelin basic protein; MMP, metalloproteinase; NFL, neurofilament light protein; TAU, microtubule-associated protein tau; TIMP1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1; VaD, Vascular Dementia. Biomarker names and reference numbers are obtained from official UniProt, PubChem, and RCSB databases.

Table 3. Genetic variants associated with silent brain infarctions and WMHs

Gene name	SNP ID number	Total N ^a	Silent brain infarcts		WMHs	
			Studies identifying association	Studies identifying no association	Studies identifying association	Studies identifying no association
AGT	rs699	19,285		104,124,125	126,127	
APOE	rs429358 rs7412	9,339		104	10,128,129	104
ACE	rs4340	5,949		130,131	81,128,132	10,104,124,125,133
MTHFR	rs1801133	3,572		104,120,134		10,104,127
IL-6	rs1800796rs1800795	3,437	35		35	
CRP	rs309358 rs1417938	3,437		35		35
	rs1800947					
	rs1205 rs2808630					
CRP	rs1130864 rs1205 rs3093068	1,303		135		135
	rs3093075					
CRP	rs3091244	144		10		
IL1B	rs 16944	144	10			
AGTR1	rs5186	93	124			
NOS3	rs1799983	93	124			

Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; AGT, angiotensinogen; AGTR1, angiotensin II receptor type 1; APOE, apolipoprotein E; CRP, C-reactive protein; IL1B, interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; NOS3, nitric oxide synthase 3; SNP, single-nucleotide polymorphism; WMHs, white matter hyperintensities. Gene names and reference SNP numbers are obtained from GeneCards database. ^aTotal N is the sum of patients included in studies.

index and MMP-3 activity was highly specific to differentiate SIVD from the control group.¹⁰²

Several combinations of CSF proteins might help to differentiate SIVD and AD from controls and from each other. Thus, markers reflecting AD pathologic assessment such as total Tau and A β 1-42 separate AD from controls, while markers assessing white matter damage such as myelin basic protein and neurofilament light polypeptide discriminate SIVD from controls. Moreover, all of them together plus MMP-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are able to distinguish between AD and SIVD with elevated sensitivity and specificity.⁹⁸

Likewise, another study performed in two independent cohorts determined a panel of 90 CSF proteins in several types of clinically established dementia (subcortical vascular dementia, AD, and mixed dementia) or at their prodromal stages (MCI), and compared them with healthy controls. On multivariate analysis, they found that heart-type fatty acid-binding protein and alpha-1 antitrypsin discriminated with 86% sensitivity and 86% specificity between those with mixed dementia and subcortical vascular dementia from controls. Also, these same diseases at their early stages (MCI) were also differentiated from controls with high accuracy by the combination of

plasminogen activator inhibitor-1, regulated on activation normal T-cell expressed and secreted protein (RANTES), tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and lipoprotein(a).¹⁰³ Interestingly also, some CSF proteins were altered in AD but not in subcortical vascular dementia, pointing to different pathophysiologic mechanisms.

A summary of CSF biomarkers and their usefulness in SIVD studies is shown in Table 2.

Genetic Markers and Subcortical Ischemic Vascular Disease

Although cSVD includes several monogenic forms (cerebral autosomal dominant arteriopathy with silent infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), Fabry's disease, etc.), it is more often a sporadic disease related to aging and hypertension.⁴ However, some pathologic traits of SIVD, such as WMHs are supposed to be inherited in a high percentage of cases (ranging from 55% to 80%).³⁷

For more than 10 years, the most used approach in genetic association studies of cSVD and SIVD was the candidate gene approach, which focuses in finding associations between genetic variants in prespecified genes and several phenotypes (WMHs, lacunar infarcts, etc.) or diseases. Many studies have described associations between

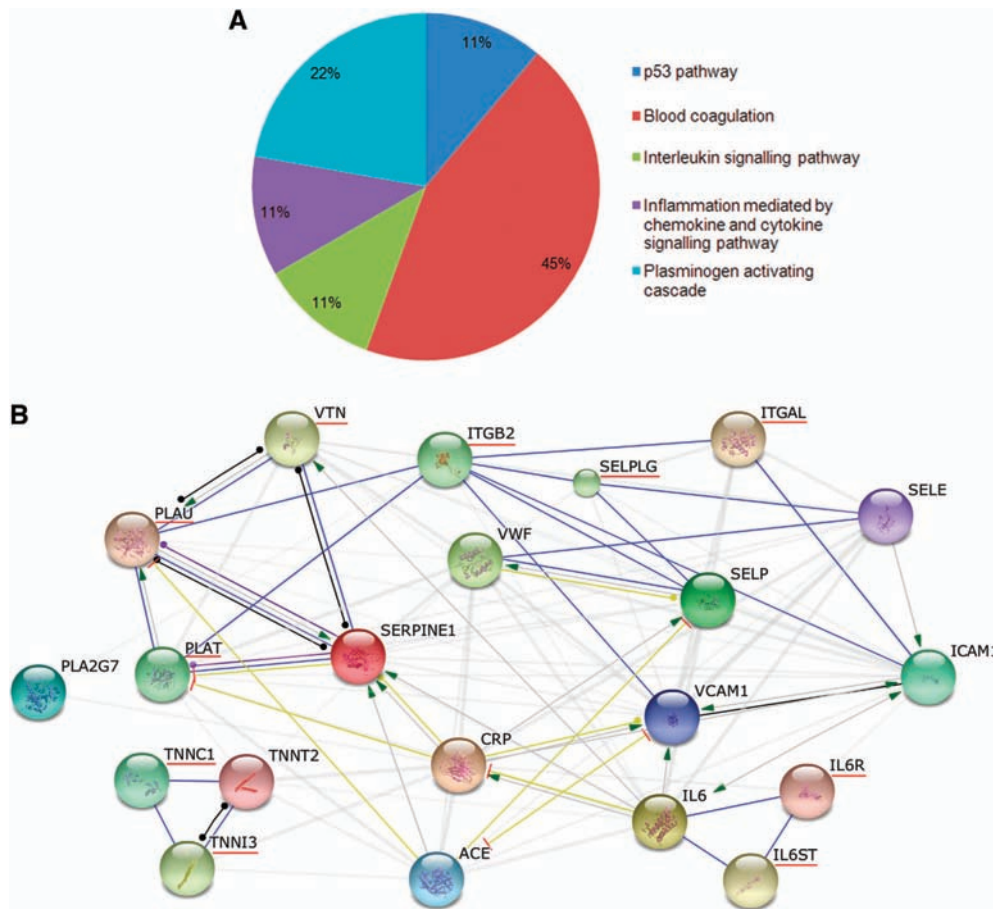


Figure 2. (A) Main molecular pathways analyzed in subcortical ischemic vascular disease (SIVD). Pie chart of molecular pathways corresponding to those biomarkers reviewed with consistent association with SIVD lesions in more than 1,000 subjects. Portions represent percentage per number of pathways. (B) Functional network of biomarkers reviewed and their predicted partners. Network chart displaying prediction methods (neighborhood, gene fusion, cooccurrence, coexpression, experiments, databases, and textmining) applied to those biomarkers reviewed with consistent association with silent brain infarct (SBI) and white matter hyperintensity (WMH), and their predicted functional partners (underlined in red). Lines represent different link evidences according to different colors, based on databases such as Saccharomyces Genome Database (SGD), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), FlyBase, and PubMed. Green head arrows: activation; red end lines: inhibition; green lines: coexpression; blue lines: binding; black lines: reaction; gray lines: statistically relevant cooccurrences of genes. Corresponding proteins to gene names of reviewed biomarkers displayed: troponin t (TNNT2), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), E-selectin (SELE), interleukin-6 (IL-6), lipoprotein phospholipase A2 (PLA2G7), C-reactive protein (CRP), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), angiotensin converting enzyme (ACE), von Willebrand factor (vWF), plasminogen activator inhibitor-1 (SERPINE1), and P-selectin (SELP). Corresponding proteins to gene names of predicted partners displayed: urokinase plasminogen activator (PLAU), vitronectin (VTN), tissue plasminogen activator (PLAT), selectin P ligand (SELPLG), integrin beta 2 (ITGB2), integrin alpha L (ITGAL), interleukin-6 signal transducer (IL6ST), interleukin-6 receptor (IL-6R), troponin I type 3 (TNNI3), and troponin C type 1 (TNNC1); STRING database (<http://string-db.org/>).

individual genes and SIVD lesions, but in general these findings have not been replicated in independent cohorts. A summary of the most studied variants is displayed in Table 3.

A meta-analysis of 46 studies, which included variants in 19 candidate genes involved in the pathogenesis of cSVD and including more than 2000 subjects found no convincing associations between APOE gene, ACE, methylenetetrahydrofolate reductase and angiotensinogen and WMHs.¹⁰⁴

Free genome-wide approaches have become available in the past few years. This approach enhances power to detect genetic associations in common diseases when combining results of different cohorts in meta-analysis. Any pathway, not only those that are suspected could be identified, but also uncovering novel genes involved in cSVD and SIVD.

Genome-wide association studies. Given the lack of consistent findings in candidate gene studies of cSVD, investigators from the

Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) consortium performed a genome-wide association study and meta-analysis, to search for genetic variants associated with SBIs. No variants were found with statistical significance at genome-wide association study level ($P < 1 \times 10^{-8}$) but 51 variants had a highly suggestive association (P value $< 1 \times 10^{-5}$). The most significant association was located in 20p2 chromosome (rs2208454), close to MACROD2 (MACRO domain containing 2) and FLRT3 (fibronectin leucine-rich transmembrane protein 3) regions. However, no associations were found in the replication cohorts included within the same study (white participants from the 3C Dijon cohort and black subjects from the ARIC cohort). Notably, no association of previously reported single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate gene studies was confirmed.¹⁰⁵

Afterwards, results from a new genome-wide association study were published with WMH burden as outcome, in which one new locus was described in chromosome 17q25. This locus contained

Table 4. Best performing biomarkers in association with cSVD

Biomarkers	MRI lesions
<i>Plasmatic biomarkers</i>	
CRP	WMH
IL-6	SBI and WMH
HCY	SBI and WMH
UACR	SBI and WMH
A β (1-42)	SBI and WMH
<i>CSF biomarkers^a</i>	
NFL	WMH
MMP-9	SBI and WMH
<i>Genetic biomarkers</i>	
chr17q25	WMH

Abbreviations: A β 1-42, amyloid β (1-42) peptide; CRP, C-reactive protein; CSF, cerebrospinal fluid; cSVD, cerebral small-vessel disease; HCY, homocysteine; IL-6, interleukin-6; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; MRI, magnetic resonance imaging; NFL, neurofilament light protein; SBI, silent brain infarct; UACR, urine albumin/creatinine ratio; WMH, white matter hyperintensities. Selection criteria: two or more replications within independent studies and more than 1,000 patients tested. ^aCSF markers had been less studied, hence sample size criteria are not applied.

several genes such as WW domain-binding protein 2, tripartite motif-containing 65, tripartite motif-containing 47, mitochondrial ribosomal protein L38, Fas-binding factor 1, and acyl-coenzyme A oxidase 1, encoding proteins that were involved in apoptosis, innate immunity, cell cycle regulation, vesicular trafficking, and neuroprotection.¹⁰⁶ Later, authors from the Rotterdam Scan study replicated these associations within the 17q25 locus and more recently, the first replication for the same locus in a non-European population was published.^{107,108} Finally, this locus was related with WMHs in a cohort of subjects with acute ischemic stroke, although on the contrary to what should be expected regarding etiology, lacunar stroke was not associated.¹⁰⁹ For us it was also an unfortunate surprise that the large METASTROKE collaboration identified interesting candidate genes for cardioembolic (PITX2 and ZFH3) and for large-vessel stroke (HDAC9) but no signal was found for small-vessel stroke.¹¹⁰ Finally, linkage studies have identified several chromosomes with shared loci associated with WMH volumes and also with blood pressure parameters, suggesting pleiotropic genes might exist in these locations.^{111,112} New genetic technology including exome sequencing and epigenetics will probably be used in the coming years and might add new players to the field.

Genetic studies in disease progression. The majority of genetic studies have focused so far on cross-sectional associations and there is much less information on the relation of genetic variants and lesion progression. To our knowledge, only a recent study, described that both HCY levels and methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variation were associated with the progression of ventricular enlargement (i.e., subcortical atrophy) after a mean follow-up of 4 years. Interestingly, this progression was parallel to the decline on executive function.⁸³

RNA approaches. Circulating RNA was used to define profiles of differentially expressed genes to distinguish small deep infarct etiologies in a cohort of 184 ischemic stroke patients. Their results revealed several pathways altered and related with immune blood cells, that were different for lacunar and nonlacunar stroke patients.¹¹³

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that regulate mRNA expression by binding to untranslated regions. There are few miRNA but each can regulate hundreds of target genes, therefore

they represent an important mechanism of gene regulation. Differential profiles of circulating miRNA for stroke subtypes, including small-vessel disease, were described in a preliminary report of a very small sample of young ischemic stroke patients, interestingly, they observed that some miRNAs remain stable expressed and in circulation even after several months from the onset of stroke and some are upregulated in small artery stroke as compared with large artery strokes (miR-130b, miR-29b, miR-301a, miR-339-5p, miR-532-5p, miR-634, and miR-886-5p).¹¹⁴

More recently, a study focused on four well-known polymorphisms in miRNA sequences (miR-146a, -149, -196a2, and -499 alleles), described an association between some allele combinations and SBIs incidence, and an effect on HCY/folate levels. These had been previously associated with regulation of tumor necrosis factor- α , methylenetetrahydrofolate reductase, annexin A1, and CRP, respectively.¹¹⁵

Future Perspectives

Here we reviewed blood and CSF biomarkers that have been related to the appearance of characteristic MRI findings in cSVD, such as SBIs and WMHs. Although these lesions appear frequently on healthy elderly individuals, their presence and progression largely predispose to future cognitive impairment, and the presence of multiple lacunar infarcts and extensive WMHs are constant in SIVD.

Available information for blood-circulating proteins highlights the involvement of several interrelated pathways (Figure 2A) including but not limited to neuroinflammation, hemostasis, and endothelial dysfunction. In addition, functional network maps using associated biomarkers may reveal new potential candidates (Figure 2B). Moreover, a deeper analysis of these pathways and links might be useful to find possible therapeutic targets in the future. A summary of the best performing biomarkers reviewed here is presented on Table 4. The majority of the studies performed to date with biomarkers show significant cross-sectional associations with several imaging or cognitive outcomes, but their predictive or discriminative ability regarding diagnosis remains to be established as well as the power of combining those different parameters in clinically useful scores.

Also, some methodological issues might trouble the translation to clinical practice, such as the lack of replication of the findings in independent cohorts. This could be due in part, to the lack of consensus in the diagnostic criteria of these lesions in the past, the different ways to provide the results (i.e., WMHs rated considered as a volume measurement or with a qualitative assessment, etc.) and the different study design or statistical methods. An international effort to develop definitions and imaging standard for markers and consequences of cSVD is taking place, which will lead in the future to overcome these limitations.¹¹⁶

Replication would also require the collaboration of multiple researchers sharing data from different populations and gathered in large consortiums. This approach has been proven useful in genome-wide association studies allowing unraveling genetic variants, which were not suspected before in this field.

Also, most studies in protein markers have analyzed mainly one or few candidate markers and, although several biomarkers involved in different pathways and combined in a diagnostic panel have been used in some recent studies, results should be replicated. Moreover, some promising candidate genes and proteins that are surrogates for the vascular risk factors behind SIVD such as hypertension might be explored and included in such panels.

Further, massive or nondirected proteomic approaches in well-characterized subjects with SIVD have not yet been performed. It is expected that in the near future, the use of this technology will lead to find new candidates.

Moreover, studies on the differentiation of different VCI subtypes have been scarcely performed in the past, most of

them with reduced sample sizes and limited power to detect associations.

Finally, regarding the potential usefulness of blood biomarkers to predict the clinical course of VCI or even to monitor responses to potential new treatments, it is worth to mention that in the past few years some large population-based cohorts have started to report their results on how these brain lesions accumulate over time and on how blood biomarkers relate to this progression. What remains to be determined is whether biomarkers change in parallel with lesion accumulation or cognitive decline and can be used as surrogate markers for disease progression.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AV-B, IR-L, and JM helped in study conception and design, acquisition of data from the literature, analysis and interpretation of data, critically revised the manuscript for important intellectual content, and approved final version. CN, AB, and VL helped in study conception and design, acquisition of data from the literature, analysis and interpretation of data, drafted the manuscript, and approved the final version. PD helped in study conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafted the article, revised it critically for important intellectual content, and approved final version.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Jokinen H, Kalska H, Mäntylä R, Pohjasvaara T, Ylikoski R, Hietanen M *et al*. Cognitive profile of subcortical ischaemic vascular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; **77**: 28–33.
- Rosenberg GA, Bjerke M, Wallin A. Multimodal markers of inflammation in the subcortical ischemic vascular disease type of vascular cognitive impairment. *Stroke* 2014; **45**: 1531–1538.
- Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *Lancet Neurol* 2013; **12**: 483–497.
- Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol* 2010; **9**: 689–701.
- Economos A, Wright CB, Moon YP, Rundek T, Rabbani L, Paik MC *et al*. Interleukin 6 plasma concentration associates with cognitive decline: the northern Manhattan study. *Neuroepidemiology* 2013; **40**: 253–259.
- Riba-Llena I, Penalba A, Pelegri D, Vilar A, Jarca CI, Filomena J *et al*. Role of lipoprotein-associated phospholipase A activity for the prediction of silent brain infarcts in women. *Atherosclerosis* 2014; **237**: 811–815.
- Vermeer SE, Longstreth WT Jr., Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol* 2007; **6**: 611–619.
- Fanning JP, Wong AA, Fraser JF. The epidemiology of silent brain infarction: a systematic review of population-based cohorts. *BMC Med* 2014; **12**: 119.
- Zhu YC, Dufouil C, Tzourio C, Chabriat H. Silent brain infarcts: a review of MRI diagnostic criteria. *Stroke* 2011; **42**: 1140–1145.
- Raz N, Yang Y, Dahle CL, Land S. Volume of white matter hyperintensities in healthy adults: contribution of age, vascular risk factors, and inflammation-related genetic variants. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1822**: 361–369.
- Kertesz A, Black SE, Tokar G, Benke T, Carr T, Nicholson L. Periventricular and subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging. 'Rims, caps, and unidentified bright objects'. *Arch Neurol* 1988; **45**: 404–408.
- Fazekas F, Niederkorn K, Schmidt R, Offenbacher H, Horner S, Bertha G *et al*. White matter signal abnormalities in normal individuals: correlation with carotid ultrasonography, cerebral blood flow measurements, and cerebrovascular risk factors. *Stroke* 1988; **19**: 1285–1288.
- Brun A, Englund E. A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study. *Ann Neurol* 1986; **19**: 253–262.
- Bjerke M, Andreasson U, Rolstad S, Nordlund A, Lind K, Zetterberg H *et al*. Subcortical vascular dementia biomarker pattern in mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009; **28**: 348–356.
- Conklin J, Silver FL, Mikulis DJ, Mandell DM. Are acute infarcts the cause of leukoaraiosis? Brain mapping for 16 consecutive weeks. *Ann Neurol* 2014; **76**: 899–904.
- van Swieten JC, van den Hout JH, van Ketel BA, Hijdra A, Wokke JH, van Gijn J. Periventricular lesions in the white matter on magnetic resonance imaging in

- the elderly. A morphometric correlation with arteriosclerosis and dilated perivascular spaces. *Brain* 1991; **114**: 761–774.
- Zhu YC, Tzourio C, Soumare A, Mazoyer B, Dufouil C, Chabriat H. Severity of dilated Virchow-Robin spaces is associated with age, blood pressure, and MRI markers of small vessel disease: a population-based study. *Stroke* 2010; **41**: 2483–2490.
- Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Schijndel RA, Fox NC *et al*. Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2004; **23**: 708–716.
- Apostolova LG, Thompson PM. Mapping progressive brain structural changes in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* 2008; **46**: 1597–1612.
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**: 89–95.
- Sullivan GW, Sarembok IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 591–602.
- Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, van der Valk P, Baker D *et al*. Inflammation in neurodegenerative diseases—an update. *Immunology* 2014; **142**: 151–166.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; **286**: 327–334.
- Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003; **290**: 2945–2951.
- Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001; **103**: 1813–1818.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K *et al*. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 2003; **108**: 2317–2322.
- Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, Furukado S, Sakaguchi M, Mochizuki H *et al*. Association between interleukin-6 levels and first-ever cerebrovascular events in patients with vascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 400–405.
- Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, Furukado S, Hougaku H, Hori M. Relations of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction. *Stroke* 2005; **36**: 768–772.
- Yoshida M, Tomitori H, Machi Y, Katagiri D, Ueda S, Horiguchi K *et al*. Acrolein, IL-6 and CRP as markers of silent brain infarction. *Atherosclerosis* 2009; **203**: 557–562.
- Yoshida M, Higashi K, Kobayashi E, Saeki N, Wakui K, Kusaka T *et al*. Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP. *Atherosclerosis* 2010; **211**: 475–479.
- Satizabal CL, Zhu YC, Mazoyer B, Dufouil C, Tzourio C. Circulating IL-6 and CRP are associated with MRI findings in the elderly: the 3C-Dijon Study. *Neurology* 2012; **78**: 720–727.
- Ishikawa J, Tamura Y, Hoshida S, Eguchi K, Ishikawa S, Shimada K *et al*. Low-grade inflammation is a risk factor for clinical stroke events in addition to silent cerebral infarcts in Japanese older hypertensives: the Jichi Medical School ABPM Study, wave 1. *Stroke* 2007; **38**: 911–917.
- Anan F, Shimomura T, Kaku T, Kaneda K, Imagawa M, Tsukagawa H *et al*. High-sensitivity C-reactive protein level is a significant risk factor for silent cerebral infarction in patients on hemodialysis. *Metabolism* 2008; **57**: 66–70.
- Kikuchi H, Anan F, Kaneda K, Nawata T, Eshima N, Saikawa T *et al*. Interleukin-6 and silent cerebral infarction in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Eur J Neurol* 2011; **18**: 625–630.
- Fornage M, Chiang YA, O'Meara ES, Psaty BM, Reiner AP, Siscovick DS *et al*. Biomarkers of inflammation and MRI-defined small vessel disease of the brain: the Cardiovascular Health Study. *Stroke* 2008; **39**: 1952–1959.
- van Dijk EJ, Prins ND, Vermeer SE, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ *et al*. C-reactive protein and cerebral small-vessel disease: the Rotterdam Scan Study. *Circulation* 2005; **112**: 900–905.
- Schmidt R, Schmidt H, Pichler M, Enzinger C, Petrovic K, Niederkorn K *et al*. C-reactive protein, carotid atherosclerosis, and cerebral small-vessel disease: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 2006; **37**: 2910–2916.
- Wright CB, Moon Y, Paik MC, Brown TR, Rabbani L, Yoshita M *et al*. Inflammatory biomarkers of vascular risk as correlates of leukoaraiosis. *Stroke* 2009; **40**: 3466–3471.
- Nagai K, Kozaki K, Sonohara K, Akishita M, Toba K. Relationship between interleukin-6 and cerebral deep white matter and periventricular hyperintensity in elderly women. *Geriatr Gerontol Int* 2011; **11**: 328–332.

- 40 Rouhl RP, Damoiseaux JG, Lodder J, Theunissen RO, Knottnerus IL, Staals J et al. Vascular inflammation in cerebral small vessel disease. *Neurobiol Aging* 2012; **33**: 1800–1806.
- 41 Aribisala BS, Wiseman S, Morris Z, Valdes-Hernandez MC, Royle NA, Maniega SM et al. Circulating inflammatory markers are associated with magnetic resonance imaging-visible perivascular spaces but not directly with white matter hyperintensities. *Stroke* 2014; **45**: 605–607.
- 42 Marsland AL, Gianaros PJ, Abramowitch SM, Manuck SB, Hariri AR. Interleukin-6 covaries inversely with hippocampal grey matter volume in middle-aged adults. *Biol Psychiatry* 2008; **64**: 484–490.
- 43 Baune BT, Ponath G, Rothermundt M, Roesler A, Berger K. Association between cytokines and cerebral MRI changes in the aging brain. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2009; **22**: 23–34.
- 44 Jefferson AL, Massaro JM, Wolf PA, Seshadri S, Au R, Vasani RS et al. Inflammatory biomarkers are associated with total brain volume: the Framingham Heart Study. *Neurology* 2007; **68**: 1032–1038.
- 45 Wada M, Nagasawa H, Kurita K, Koyama S, Arawaka S, Kawanami T et al. Cerebral small vessel disease and C-reactive protein: results of a cross-sectional study in community-based Japanese elderly. *J Neurol Sci* 2008; **264**: 43–49.
- 46 de Leeuw FE, de Groot JC, Achten E, Oudkerk M, Ramos LM, Heijboer R et al. Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: a population based magnetic resonance imaging study. The Rotterdam Scan Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; **70**: 9–14.
- 47 van den Heuvel DM, Admiraal-Behloul F, ten Dam VH, Olofsen H, Bollen EL, Murray HM et al. Different progression rates for deep white matter hyperintensities in elderly men and women. *Neurology* 2004; **63**: 1699–1701.
- 48 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; **115**: 1285–1295.
- 49 Sarchielli P, Nardi K, Chiasserini D, Eusebi P, Tantucci M, Di Piero V et al. Immunological profile of silent brain infarction and lacunar stroke. *PLoS One* 2013; **8**: e68428.
- 50 Kawamura T, Umemura T, Kanai A, Nagashima M, Nakamura N, Uno T et al. Soluble adhesion molecules and C-reactive protein in the progression of silent cerebral infarction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2006; **55**: 461–466.
- 51 Umemura T, Kawamura T, Sakakibara T, Kanai A, Sano T, Hotta N et al. Association of soluble adhesion molecule and C-reactive protein levels with silent brain infarction in patients with and without type 2 diabetes. *Curr Neurovasc Res* 2008; **5**: 106–111.
- 52 Fassbender K, Bertsch T, Mielke O, Muhlhauser F, Hennerici M. Adhesion molecules in cerebrovascular diseases. Evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large- and small-vessel disease. *Stroke* 1999; **30**: 1647–1650.
- 53 Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, Parmar K, Bamford JM, Briley D et al. Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis. *Brain* 2003; **126**: 424–432.
- 54 Han JH, Wong KS, Wang YY, Fu JH, Ding D, Hong Z. Plasma level of sICAM-1 is associated with the extent of white matter lesion among asymptomatic elderly subjects. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; **111**: 847–851.
- 55 Markus HS, Hunt B, Palmer K, Enzinger C, Schmidt H, Schmidt R. Markers of endothelial and hemostatic activation and progression of cerebral white matter hyperintensities: longitudinal results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 2005; **36**: 1410–1414.
- 56 de Leeuw FE, de Kleine M, Frijns CJ, Fijnheer R, van Gijn J, Kappelle LJ. Endothelial cell activation is associated with cerebral white matter lesions in patients with cerebrovascular disease. *Ann NY Acad Sci* 2002; **977**: 306–314.
- 57 Seshadri S, Wolf PA, Beiser AS, Selhub J, Au R, Jacques PF et al. Association of plasma total homocysteine levels with subclinical brain injury: cerebral volumes, white matter hyperintensity, and silent brain infarcts at volumetric magnetic resonance imaging in the Framingham Offspring Study. *Arch Neurol* 2008; **65**: 642–649.
- 58 Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, Bell R, D'Souza R, Jeffery S et al. Homocysteine is a risk factor for cerebral small vessel disease, acting via endothelial dysfunction. *Brain* 2004; **127**: 212–219.
- 59 Kloppenborg RP, Geerlings MI, Visseren FL, Mali WP, Vermeulen M, van der Graaf Y et al. Homocysteine and progression of generalized small-vessel disease: the SMART-MR Study. *Neurology* 2014; **82**: 777–783.
- 60 Khan U, Hassan A, Vallance P, Markus HS. Asymmetric dimethylarginine in cerebral small vessel disease. *Stroke* 2007; **38**: 411–413.
- 61 Pavlovic AM, Pekmezovic T, Obrenovic R, Novakovic I, Tomic G, Mijajlovic M et al. Increased total homocysteine level is associated with clinical status and severity of white matter changes in symptomatic patients with subcortical small vessel disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2011; **113**: 711–715.
- 62 Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G et al. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2010; **5**: e12244.
- 63 Hankey GJ, Ford AH, Yi Q, Eikelboom JW, Lees KR, Chen C et al. Effect of B vitamins and lowering homocysteine on cognitive impairment in patients with previous stroke or transient ischemic attack: a prespecified secondary analysis of a randomized, placebo-controlled trial and meta-analysis. *Stroke* 2013; **44**: 2232–2239.
- 64 Clarke R, Bennett D, Parish S, Lewington S, Skeaff M, Eussen SJ et al. Effects of homocysteine lowering with B vitamins on cognitive aging: meta-analysis of 11 trials with cognitive data on 22,000 individuals. *Am J Clin Nutr* 2014; **100**: 657–666.
- 65 Pikula A, Boger RH, Beiser AS, Maas R, DeCarli C, Schwedhelm E et al. Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham offspring study. *Stroke* 2009; **40**: 2959–2964.
- 66 Gurol ME, Irizarry MC, Smith EE, Raju S, Diaz-Arrastia R, Bottiglieri T et al. Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2006; **66**: 23–29.
- 67 Gomis M, Sobrino T, Ois A, Millan M, Rodriguez-Campello A, Perez de la Ossa N et al. Plasma beta-amyloid 1-40 is associated with the diffuse small vessel disease subtype. *Stroke* 2009; **40**: 3197–3201.
- 68 van Dijk EJ, Prins ND, Vermeer SE, Hofman A, van Duijn CM, Koudstaal PJ et al. Plasma amyloid beta, apolipoprotein E, lacunar infarcts, and white matter lesions. *Ann Neurol* 2004; **55**: 570–575.
- 69 Kaffashian S, Tzourio C, Soumare A, Dufouil C, Zhu Y, Crivello F et al. Plasma beta-amyloid and MRI markers of cerebral small vessel disease: Three-City Dijon Study. *Neurology* 2014; **83**: 2038–2045.
- 70 Wada M, Nagasawa H, Kurita K, Koyama S, Arawaka S, Kawanami T et al. Microalbuminuria is a risk factor for cerebral small vessel disease in community-based elderly subjects. *J Neurol Sci* 2007; **255**: 27–34.
- 71 Delgado P, Riba-Llena I, Tovar JL, Jarca CI, Mundet X, Lopez-Rueda A et al. Prevalence and associated factors of silent brain infarcts in a Mediterranean cohort of hypertensives. *Hypertension* 2014; **64**: 658–663.
- 72 Knopman DS, Mosley TH Jr, Bailey KR, Jack CR Jr, Schwartz GL, Turner ST. Associations of microalbuminuria with brain atrophy and white matter hyperintensities in hypertensive sibships. *J Neurol Sci* 2008; **271**: 53–60.
- 73 Pikula A, Beiser AS, DeCarli C, Himali JJ, Debette S, Au R et al. Multiple biomarkers and risk of clinical and subclinical vascular brain injury: the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2012; **125**: 2100–2107.
- 74 Vischer UM, von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1186–1193.
- 75 Kozuka K, Kohriyama T, Nomura E, Ikeda J, Kajikawa H, Nakamura S. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke—sequential change and differences in stroke subtype. *Atherosclerosis* 2002; **161**: 161–168.
- 76 Tomimoto H, Akiguchi I, Ohtani R, Yagi H, Kanda M, Shibasaki H et al. The coagulation-fibrinolysis system in patients with leukoaraiosis and Binswanger disease. *Arch Neurol* 2001; **58**: 1620–1625.
- 77 Gottesman RF, Cumiskey C, Chambliss L, Wu KK, Aleksic N, Folsom AR et al. Hemostatic factors and subclinical brain infarction in a community-based sample: the ARIC study. *Cerebrovasc Dis* 2009; **28**: 589–594.
- 78 Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Hoshide S, Shimada K. Hyperinsulinemia and hemostatic abnormalities are associated with silent lacunar cerebral infarcts in elderly hypertensive subjects. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**: 871–877.
- 79 Nagai M, Hoshide S, Kario K. Association of prothrombotic status with markers of cerebral small vessel disease in elderly hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2012; **25**: 1088–1094.
- 80 Kearney-Schwartz A, Rossignol P, Bracard S, Felblinger J, Fay R, Boivin JM et al. Vascular structure and function is correlated to cognitive performance and white matter hyperintensities in older hypertensive patients with subjective memory complaints. *Stroke* 2009; **40**: 1229–1236.
- 81 Hassan A, Lansbury A, Catto AJ, Guthrie A, Spencer J, Craven C et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with leukoaraiosis in lacunar syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; **72**: 343–346.
- 82 Brenner D, Labreuche J, Pico F, Scheltens P, Poirier O, Cambien F et al. The renin-angiotensin-aldosterone system in cerebral small vessel disease. *J Neurol* 2008; **255**: 993–1000.
- 83 Jochemsen HM, Geerlings MI, Grool AM, Vincken KL, Mali WP, van der Graaf Y et al. Angiotensin-converting enzyme and progression of white matter lesions and brain atrophy—the SMART-MR study. *J Alzheimers Dis* 2012; **29**: 39–49.
- 84 Konnecke H, Bechmann I. The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clin Dev Immunol* 2013; **2013**: 914104.
- 85 Rosenberg GA, Sullivan N, Esiri MM. White matter damage is associated with matrix metalloproteinases in vascular dementia. *Stroke* 2001; **32**: 1162–1168.

- 86 Romero JR, Vasan RS, Beiser AS, Au R, Benjamin EJ, DeCarli C et al. Association of matrix metalloproteinases with MRI indices of brain ischemia and aging. *Neurobiol Aging* 2010; **31**: 2128–2135.
- 87 Gouw AA, van der Flier WM, Fazekas F, van Straaten EC, Pantoni L, Poggesi A et al. Progression of white matter hyperintensities and incidence of new lacunes over a 3-year period: the Leukoaraiosis and Disability study. *Stroke* 2008; **39**: 1414–1420.
- 88 Schilling S, Tzourio C, Dufouil C, Zhu Y, Berr C, Alperovitch A et al. Plasma lipids and cerebral small vessel disease. *Neurology* 2014; **83**: 1844–1852.
- 89 Willey JZ, Gardener H, Moon YP, Yoshita M, DeCarli C, Cheung YK et al. Lipid profile components and subclinical cerebrovascular disease in the northern Manhattan study. *Cerebrovasc Dis* 2014; **37**: 423–430.
- 90 Gregson J, Stirnadel-Farrant HA, Doobaree IU, Koro C. Variation of lipoprotein associated phospholipase A2 across demographic characteristics and cardiovascular risk factors: a systematic review of the literature. *Atherosclerosis* 2012; **225**: 11–21.
- 91 Fitzpatrick AL, Irizarry MC, Cushman M, Jenny NS, Chi GC, Koro C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of dementia in the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 2014; **235**: 384–391.
- 92 Dadu RT, Fornage M, Virani SS, Nambi V, Hoogeveen RC, Boerwinkle E et al. Cardiovascular biomarkers and subclinical brain disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Stroke* 2013; **44**: 1803–1808.
- 93 Heo SH, Lee SH. High levels of serum uric acid are associated with silent brain infarction. *J Neurol Sci* 2010; **297**: 6–10.
- 94 Shih CY, Chen CY, Wen CJ, Liu HM, Kuo HK. Relationship between serum uric acid and cerebral white matter lesions in the elderly. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; **22**: 154–159.
- 95 Hudson BI, Moon YP, Kalea AZ, Khatri M, Marquez C, Schmidt AM et al. Association of serum soluble receptor for advanced glycation end-products with subclinical cerebrovascular disease: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Atherosclerosis* 2011; **216**: 192–198.
- 96 Jonsson M, Zetterberg H, van Straaten E, Lind K, Syversen S, Edman A et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of white matter lesions - cross-sectional results from the LADIS study. *Eur J Neurol* 2010; **17**: 377–382.
- 97 Jonsson M, Zetterberg H, Rolstad S, Edman A, Gouw AA, Bjerke M et al. Low cerebrospinal fluid sulfatide predicts progression of white matter lesions: The LADIS study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2012; **34**: 61–67.
- 98 Bjerke M, Zetterberg H, Edman A, Blennow K, Wallin A, Andreasson U. Cerebrospinal fluid matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in combination with subcortical and cortical biomarkers in vascular dementia and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011; **27**: 665–676.
- 99 Rosengren LE, Karlsson JE, Sjogren M, Blennow K, Wallin A. Neurofilament protein levels in CSF are increased in dementia. *Neurology* 1999; **52**: 1090–1093.
- 100 Sjogren M, Blomberg M, Jonsson M, Wahlund LO, Edman A, Lind K et al. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a marker of white matter changes. *J Neurosci Res* 2001; **66**: 510–516.
- 101 Wallin A, Sjogren M, Edman A, Blennow K, Regland B. Symptoms, vascular risk factors and blood-brain barrier function in relation to CT white-matter changes in dementia. *Eur Neurol* 2000; **44**: 229–235.
- 102 Candelario-Jalil E, Thompson J, Taheri S, Grossetete M, Adair JC, Edmonds E et al. Matrix metalloproteinases are associated with increased blood-brain barrier opening in vascular cognitive impairment. *Stroke* 2011; **42**: 1345–1350.
- 103 Ohrfelt A, Andreasson U, Simon A, Zetterberg H, Edman A, Potter W et al. Screening for new biomarkers for subcortical vascular dementia and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2011; **1**: 31–42.
- 104 Paternoster L, Chen W, Sudlow CL. Genetic determinants of white matter hyperintensities on brain scans: a systematic assessment of 19 candidate gene polymorphisms in 46 studies in 19,000 subjects. *Stroke* 2009; **40**: 2020–2026.
- 105 Dobbie S, Bis JC, Fornage M, Schmidt H, Ikram MA, Sigurdsson S et al. Genome-wide association studies of MRI-defined brain infarcts: meta-analysis from the CHARGE Consortium. *Stroke* 2010; **41**: 210–217.
- 106 Fornage M, Dobbie S, Bis JC, Schmidt H, Ikram MA, Dufouil C et al. Genome-wide association studies of cerebral white matter lesion burden: the CHARGE consortium. *Ann Neurol* 2011; **69**: 928–939.
- 107 Verhaaren BF, de Boer R, Vernooij MW, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A et al. Replication study of chr17q25 with cerebral white matter lesion volume. *Stroke* 2011; **42**: 3297–3299.
- 108 Tabara Y, Igase M, Okada Y, Nagai T, Uetani E, Kido T et al. Association of Chr17q25 with cerebral white matter hyperintensities and cognitive impairment: the J-SHIP study. *Eur J Neurol* 2013; **20**: 860–862.
- 109 Adib-Samii P, Rost N, Traylor M, Devan W, Biffi A, Lanfranconi S et al. 17q25 Locus is associated with white matter hyperintensity volume in ischemic stroke, but not with lacunar stroke status. *Stroke* 2013; **44**: 1609–1615.
- 110 Traylor M, Farrall M, Holliday EG, Sudlow C, Hopewell JC, Cheng YC et al. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 2012; **11**: 951–962.
- 111 Kochunov P, Glahn D, Lancaster J, Winkler A, Kent JW Jr., Olvera RL et al. Whole brain and regional hyperintense white matter volume and blood pressure: overlap of genetic loci produced by bivariate, whole-genome linkage analyses. *Stroke* 2010; **41**: 2137–2142.
- 112 Turner ST, Fornage M, Jack CR Jr, Mosley TH, Knopman DS, Kardina SL et al. Genomic susceptibility loci for brain atrophy, ventricular volume, and leukoaraiosis in hypertensive sibships. *Arch Neurol* 2009; **66**: 847–857.
- 113 Jickling GC, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Tian Y, Liu D et al. Profiles of lacunar and nonlacunar stroke. *Ann Neurol* 2011; **70**: 477–485.
- 114 Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, Lim KY, Setyowati KD, Wang CW et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. *PLoS One* 2009; **4**: e7689.
- 115 Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, Oh SH, Oh D, Shin BS et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 420–430.
- 116 Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 2013; **12**: 822–838.
- 117 Oncel C, Demir S, Guler S, Cenkli U, Tabak E, Kiroglu Y. Association between cholesterol, homocysteine and silent brain infarcts. *Intern Med J* 2009; **39**: 150–155.
- 118 Park SY, An SA, Lee HB, Kim Y, Kim NK, Kim SH et al. Different impact of hyperhomocysteinemia on cerebral small vessel ischemia and cervico-cerebral atherosclerosis in non-stroke individuals. *Thromb Res* 2013; **131**: e12–e16.
- 119 Vermeer SE, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Clarke R et al. Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: the Rotterdam Scan Study. *Ann Neurol* 2002; **51**: 285–289.
- 120 Matsui T, Arai H, Yuzuriha T, Yao H, Miura M, Hashimoto S et al. Elevated plasma homocysteine levels and risk of silent brain infarction in elderly people. *Stroke* 2001; **32**: 1116–1119.
- 121 Ravera M, Ratto E, Vettoretti S, Viazzi F, Leoncini G, Parodi D et al. Microalbuminuria and subclinical cerebrovascular damage in essential hypertension. *J Nephrol* 2002; **15**: 519–524.
- 122 Kawamura T, Umemura T, Kanai A, Uno T, Matsumae H, Sano T et al. The incidence and characteristics of silent cerebral infarction in elderly diabetic patients: association with serum-soluble adhesion molecules. *Diabetologia* 1998; **41**: 911–917.
- 123 Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Oda N, Tanaka A et al. Silent brain infarction and platelet activation in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**: 612–617.
- 124 Henskens LH, Kroon AA, van Boxtel MP, Hofman PA, de Leeuw PW. Associations of the angiotensin II type 1 receptor A1166C and the endothelial NO synthase G894T gene polymorphisms with silent subcortical white matter lesions in essential hypertension. *Stroke* 2005; **36**: 1869–1873.
- 125 Gormley K, Bevan S, Markus HS. Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin system and cerebral small vessel disease. *Cerebrovasc Dis* 2007; **23**: 148–155.
- 126 Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K et al. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *Am J Hypertens* 2000; **13**: 121–127.
- 127 van Rijn MJ, Bos MJ, Isaacs A, Yazdanpanah M, Arias-Vasquez A, Stricker BH et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system are associated with blood pressure, atherosclerosis and cerebral white matter pathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; **78**: 1083–1087.
- 128 Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bene J et al. Specific APO E genotypes in combination with the ACE D/D or MTHFR 677TT mutation yield an independent genetic risk of leukoaraiosis. *Acta Neurol Scand* 2004; **109**: 222–227.
- 129 Lemmens R, Gorner A, Schrooten M, Thijs V. Association of apolipoprotein E epsilon2 with white matter disease but not with microbleeds. *Stroke* 2007; **38**: 1185–1188.
- 130 Notsu Y, Nabika T, Park HY, Masuda J, Kobayashi S. Evaluation of genetic risk factors for silent brain infarction. *Stroke* 1999; **30**: 1881–1886.
- 131 Hong SH, Park HM, Ahn JY, Kim OJ, Hwang TS, Oh D et al. ACE I/D polymorphism in Korean patients with ischemic stroke and silent brain infarction. *Acta Neurol Scand* 2008; **117**: 244–249.
- 132 Purandare N, Oude Voshaar RC, Davidson Y, Gibbons L, Hardicre J, Byrne J et al. Deletion/insertion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and white matter hyperintensities in dementia: a pilot study. *J Am Geriatr Soc* 2006; **54**: 1395–1400.

- 133 Tascilar N, Dursun A, Ankarali H, Mungan G, Ekem S, Baris S. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism has no effect on the risk of atherosclerotic stroke or hypertension. *J Neurol Sci* 2009; **285**: 137–141.
- 134 Han IB, Kim OJ, Ahn JY, Oh D, Hong SP, Huh R *et al*. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T and 1298A>C) polymorphisms and haplotypes with silent brain infarction and homocysteine levels in a Korean population. *Yonsei Med J* 2010; **51**: 253–260.
- 135 Reitz C, Berger K, de Maat MP, Stoll M, Friedrichs F, Kardys I *et al*. CRP gene haplotypes, serum CRP, and cerebral small-vessel disease: the Rotterdam Scan Study and the MEMO Study. *Stroke* 2007; **38**: 2356–2359.

Supplementary Information accompanies the paper on the Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism website (<http://www.nature.com/jcbfm>)

Anexo II

Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 activity for the prediction of silent
brain infarcts in women
[Atherosclerosis](#). 2014 Dec; 237 (2):811-5.



Role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity for the prediction of silent brain infarcts in women



Iolanda Riba-Llena^a, Anna Penalba^a, Dolors Pelegrí^b, Andrea Vilar^a, Carme I. Jarca^c, Josefina Filomena^d, Joan Montaner^{a,e}, Pilar Delgado^{a,*}, on behalf of the ISSYS Study Group

^a Neurovascular Research Lab, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

^b Clinical Biochemistry Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^c Emergency Department, CUAP Horta, Barcelona, Spain

^d Clot Primary Care Center, Institut Català de Salut, Barcelona, Spain

^e Stroke Unit and Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2014

Received in revised form

15 October 2014

Accepted 4 November 2014

Available online 10 November 2014

Keywords:

Lipoprotein-associated phospholipase A₂

Platelet-activating factor Hydrolase

Brain infarction

Stroke

Atherosclerosis

ABSTRACT

Objectives: Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂), predicts risk of coronary events and stroke and might be associated with cerebral small vessel disease. We aimed to determine whether silent brain infarcts relate to Lp-PLA₂ activity and also, whether the addition of Lp-PLA₂ activity to prognostic clinical models improves silent brain infarcts' discrimination. **Methods:** Cross-sectional study in 921 stroke-free individuals. On baseline, demographic and vascular risk factors were collected and a brain magnetic resonance was performed to assess for the presence of silent brain infarcts. Serum Lp-PLA₂ activity was tested by an enzymatic assay (PLAC Test for activity) for all study participants and 49 healthy individuals free of vascular risk factors. Multivariate analysis and Integrated Discrimination Improvement were performed to assess whether Lp-PLA₂ activity was independently associated with silent brain infarcts and improved their discrimination added to clinical variables. **Results:** Lp-PLA₂ activity was independently associated with silent brain infarcts in women (OR per one standard deviation increase: 2.14, from 1.31 to 3.50) but not in men (OR = 1.09, from 0.81 to 1.48) after adjustment by age, diastolic blood pressure, total cholesterol, statin treatment and other potential confounders. Adding Lp-PLA₂ to clinical information for SBIs diagnosis resulted in a non-significant and mild improvement in discrimination (IDI = 3.1%) in women. **Conclusions:** Although Lp-PLA₂ is independently associated with silent brain infarcts in women, its addition to clinical variables does not lead to any improvement in their prediction.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Background

Silent brain infarcts (SBIs) are well known markers of stroke and dementia [1]. They constitute a significant burden of brain vascular disease and given their association with increasing age, their prevalence and consequences are expected to grow in the near future.

The recognition of the association with increased risk of strokes and dementia in those with SBIs represents an opportunity for intervention and prevention of future poor outcomes. However,

future trials are needed to demonstrate the therapeutic gain of this approach by reducing the occurrence of strokes [2]. In this setting, the use of blood biomarkers may facilitate early detection of SBIs and the implementation of preventive treatments in populations at risk.

Some cardiovascular biomarkers, such as troponin T and N-terminal brain natriuretic peptide have been associated not only with the presence but also with the appearance of new SBIs [3]. Other circulating proteins, related to systemic inflammation, have been extensively studied in relation to silent brain infarcts and to other markers of cerebral small vessel disease, such as white matter lesions or measures of brain atrophy. The best known inflammatory biomarkers are C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6), which have been associated with cerebral small vessel disease in most (though not all) of the studies performed to date [4–13].

* Corresponding author. Neurovascular Research Lab, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Passeig Vall d'Hebron, no. 119-129, CP 08035 Barcelona, Spain.

E-mail address: pilar.delgado@vhir.org (P. Delgado).

Other less explored biomarkers in this field are myeloperoxidase, and lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) mass which were associated with white matter lesions volumes [14].

Regarding Lp-PLA₂, this is a serine lipase which circulates mainly linked to low-density lipoproteins and, in a small fraction, to high-density lipoproteins. Lp-PLA₂ is known to be a good predictor of both first-ever coronary events and ischemic stroke in population-based studies [15] and it is approved by the Food and Drug Administration as a predictor of vascular risk. Also, it has been associated with the risk of recurrent strokes [16–18]. Lp-PLA₂ is suggested to be involved in the development of atherosclerotic stroke [19], but there are also some evidences linking Lp-PLA₂ with cerebral small vessel disease [14,20].

In this study, we hypothesized that Lp-PLA₂ activity might be as well associated with the presence of silent brain infarcts, as markers of cerebral small vessel disease and further we explored whether the addition of Lp-PLA₂ activity to prognostic models containing clinical information improves SBIs discrimination.

2. Materials and methods

Subjects for this study are included within the ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives: a magnetic resonance imaging Study), a cohort study on a randomly selected sample of hypertensive individuals, aged 50 to 70 and without prior stroke or dementia. Details on subject selection and baseline procedures have been published elsewhere [21,22].

Briefly, subjects in this study were randomly recruited from primary care centers in the city of Barcelona, between November 2010 and May 2012. Inclusion criteria which were verified first by the responsible primary care physicians and further by trained investigators after reviewing clinical records and interviewing the patient during the baseline visit, consisted on: 1) Patients with essential hypertension diagnosed at least one year earlier; 2) Age comprised between 50 and 70 years; and 3) Patients who gave their informed consent to participate in the study. Patients were excluded when: 1) they had history of previous stroke or dementia; 2) brain MRI was contraindicated; 3) there was a suspicion of white coat hypertension syndrome or 4) patients were affected by a terminal illness preventing any future follow-up examination, based on the investigator criteria. In case of suspicion of secondary hypertension, the patients were referred to other medical specialists (i.e. endocrinologist, nephrologist, etc.) for further evaluation and were not included in this study.

After inclusion, participants were asked about demographical data and personal medical history, including questions about the presence of other vascular risk factors such as diabetes mellitus, dyslipidemia and smoking habit (current, former, never), among others. Diabetes mellitus was defined as fasting glucose levels over 7 mmol/L or the use of oral antidiabetic drugs or insulin. Dyslipidemia was defined as total cholesterol over 5.2 mmol/L, triglycerides over 2.3 mmol/L and/or the use of lipid lowering treatments. Also, a directed questioning and review of medical records was performed to assess for the existence of a previous cardiovascular or kidney disease. For those participants without previous vascular disease, global vascular risk was estimated by applying the Framingham-calibrated REGICOR function [23] and participants were divided into the following categories depending on their 10-year risk of having a coronary event: low risk (<5%), moderate risk (5–9.9%), high risk (10–14.9%) and very high risk (≥15%).

Hypertension stage and blood pressure control as defined in the 2007 guidelines of the European Hypertension/Cardiology Societies [24] were also recorded, together with the duration of hypertension for each individual.

A brain MRI was performed to evaluate the presence of SBIs which were defined as lesions of ≥3 mm in their widest diameter, with cerebrospinal fluid-like signal characteristics in all pulse sequences, and a hyperintense rim surrounding the lesion in FLAIR images [25]. All examinations were performed with the same 1.5 T MR (Signa HDx 1.5, General Electrics, Waukesha, WI), including axial T1, T2 and FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) weighted images. SBIs were differentiated from enlarged perivascular spaces based on their size, shape and location. All images were primarily assessed by two neuroradiologists and in a second term by the same readers plus an experienced stroke neurologist, all blinded to clinical characteristics. Intra-rater agreement (which was calculated for each reader in a training set before undertaking the actual reading) and inter-rater agreements ranged from 0.6 to 0.75. Disagreements in assessments were solved by consensus [21].

Blood samples were drawn from each participant at baseline visit and serum was obtained after 15 min centrifugation and frozen for further analysis. Total cholesterol (Olympus, Lismeehan, Ireland) and Lp-PLA₂ activity (PLAC test for activity, diaDexus Inc.) were determined using enzyme assays on a single automated clinical chemistry analyzer (Olympus AU 2700) and in the same laboratory. Lp-PLA₂ measurements were obtained once in each patient and were conducted between July and August 2012. For Lp-PLA₂, intra-assay and inter-assay variation were less than 2.5% at the lowest and highest concentrations, as others reported before [26]. In 51 patients (5.2% from the total sample), Lp-PLA₂ activity could not be determined, because of excessive turbidity of the sample or hemolysis. In these conditions, according to the manufacturer's instructions, results might be erroneous and must be discarded.

In addition to ISSYS participants, 49 healthy subjects free of vascular risk factors and vascular diseases, were tested and their values were used as reference group. They were matched by gender with the study participants but significantly younger than them (median age = 51 versus 64 years old, $p = 0.001$).

All statistical analyses were conducted using SPSS version 17.0. For descriptive purposes, normality for continuous variables was assessed by Kolmogorov–Smirnov test. Since Lp-PLA₂ activity was not normally distributed, values are given in median and interquartile range. In univariate analysis, continuous variables were compared using *t*-test and ANOVA or Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis test when appropriate. Categorical variables were compared using Pearson χ^2 and continuous data were analyzed using Pearson or Spearman correlation depending on their normality. We set statistical significance at p value <0.05. SBIs were dichotomized into 2 categories (present/absent). We performed univariate and multivariate analysis to relate Lp-PLA₂ activity to the presence of SBIs. Multivariate models were adjusted by age, gender, dyslipidemia, diastolic blood pressure (DBP), diabetes and current smoking (since all have been associated with SBIs in our sample or in other previous studies), and also by total cholesterol, statin treatment and by the presence of an established cardiovascular disease. Moreover, since differences are described for Lp-PLA₂ regarding gender, we tested for interaction with gender in the association between Lp-PLA₂ activity and the presence of SBIs.

Further, to look for the presence of a threshold effect, Lp-PLA₂ was divided into quartiles in women and, in order to compare global diagnostic accuracy of a model with only clinical variables and a model including such clinical variables plus Lp-PLA₂ activity, receiver operator curves (ROC) were configured and the area under the curves compared by means of Delong's method [27] using MedCalc 12.4 software. Improvements on the performance of clinical variables (clinical model) by adding the information on Lp-PLA₂ activity were measured by the Integrated Discrimination

Improvement (IDI) statistic, which assesses improvement in risk discrimination (i.e. how well a model separates subjects with SBIs as compared to those without them) by estimating the change in the difference in the mean predicted probabilities of the SBIs between those with and without SBIs, after introducing Lp-PLA₂ activity to the clinical model. Positive values indicate improved discrimination.

This study was approved by our local institutional review committee and all subjects gave informed consent to participate.

3. Results

A total of 921 individuals (51.7% women, mean age 64) were included. Baseline clinical characteristics for the whole study and by levels of Lp-PLA₂ activity are presented in Table 1.

Lp-PLA₂ activity was found significantly different according to gender (higher in males than in females) and to the presence of several vascular risk factors (smoking habit, diabetes). Also, as expected, Lp-PLA₂ activity levels varied regarding the presence of dyslipidemia, statin use and increasing global vascular risk (all *p* value <0.05).

Concerning the presence of SBIs in this sample, 93 subjects (10.1%) had one or more SBI (66.7% one, 19.3% two, 14% three or more SBIs). Among the factors associated with the presence of SBIs,

we found older age, male gender, history of dyslipidemia, and higher diastolic blood pressure (DBP) (all *p* values <0.05). Also, those with a history of previous vascular disease (12.5%) had more often SBIs than those without it (22.6 versus 11.4%, *p* = 0.002). SBIs cases were not different from non-SBIs cases regarding BP control or the duration of hypertension (all *p* > 0.05).

Lp-PLA₂ activity was associated with the presence of SBIs (Fig. 1) and also with their number (*r* = 0.07, *p* = 0.04), suggesting a graded association.

In order to determine if Lp-PLA₂ was independently associated with SBIs, we performed a multivariate analysis adjusting for all factors associated with SBIs in the univariate analysis plus other potential confounders (such as diabetes, smoking habit, statin treatment, total cholesterol and the interaction term between Lp-PLA₂ and gender). As it is shown in Table 2, Lp-PLA₂ activity remained as a significant predictor of SBIs for women (OR for increase in one standard deviation = 2.14, 95% confidence interval, 1.31–3.50) but not for men (OR for increase in one standard deviation = 1.09, 95% confidence interval, 0.81–1.48) after full adjustment. Further, in order to establish whether there was a threshold effect in the relationship between Lp-PLA₂ and SBI in women, we divided Lp-PLA₂ into quartiles and found that those women at the top quartile (corresponding to a level of 189 nmol/mL/min) were at more than three times (OR = 3.4, confidence interval from 1.38 to 8.41, *p* = 0.008) higher risk of having SBIs as compared with the remaining ones. These results were not changed after adding BP control, stage or duration of hypertension as potential confounders (data not shown).

Despite these associations, overall predictive capacity of the model measured with the area under the curve did not significantly differ with (0.73) and without (0.68) adding Lp-PLA₂ activity to clinical variables (*p* = 0.40). Similarly, discrimination was only slightly and non-significantly (IDI = 3.1%, *p* value = 0.12) increased in women for prediction of SBIs (Fig. 2).

4. Discussion

Here we found that Lp-PLA₂ activity is associated with the presence of SBIs in women, independently of traditional vascular

Table 1
Baseline characteristics associated with Lp-PLA₂ activity levels.

Characteristic	Prevalence (%)	Lp-PLA ₂ activity (nmol/mL/min)
Marker level		181 (153–215)
Age		
• ≤64 years	55.9	183 (153–219)
• >64 years	44.1	179 (151–212)
Gender		
• Women	51.7	165.5 (142–183)**
• Men	48.3	204 (168–233)
Active smoker		
• No	84.9	183 (155–217)**
• Yes	15.1	195 (165–233)
Diabetes		
• No	76.5	186 (156–225)**
• Yes	23.5	177 (156–213)
Dyslipidemia		
• No	28.6	195 (169–229)*
• Yes	71.4	179 (155–218)
Total cholesterol (mmol/L)		
• ≤5.6	50.4	172 (143–208)**
• >5.6	49.6	189 (164–222)
Statins use		
• No	57.1	197 (168–232)**
• Yes	42.9	172 (144–203)
Established CVD		
• No	87.5	183 (154–217)**
• Yes	12.5	170 (141–201)
Global vascular risk		
• Low risk	24.8	163.5 (140–189)**
• Moderate risk	45.4	188 (163–222)
• High risk	13.2	195 (161–232)
• Very high risk	16.6	179 (148–220)
Duration of hypertension		
• Below median	50	182 (151–220)
• Above median	50	179 (153–213)
Blood pressure control		
• Poor	64	177 (151–214)
• Optimal	36	187 (155–224)
Hypertension stage		
• Normal-High normal	44.2	182 (152–216)
• Grade 1	41.5	181 (154–216)
• Grade 2	12	179 (150–204)
• Grade 3	2.3	175 (154–221)

Data is expressed as percentage and median (interquartile range); CVD: cardiovascular disease.* *p*-value <0.05, ***p*-value <0.01.

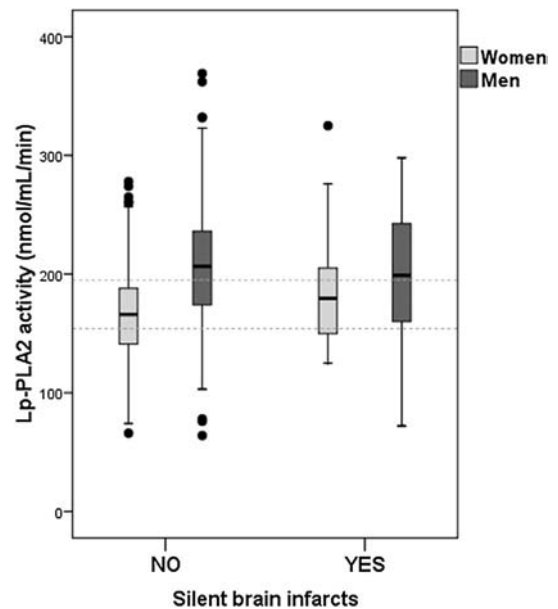


Fig. 1. Lp-PLA₂ activity levels according to the presence of SBIs and divided by gender. Dashed lines represent interquartile range for the reference group. Differences are found between groups and genders (all *p* < 0.05).

Table 2
Interaction between gender and Lp-PLA₂ activity levels in relation to the presence of SBIs.

Gender	N SBI	OR (95% CI) per SD	p-value	p- interaction
All (n = 921)	93	1.29 (0.98–1.69)	0.067	
Men (n = 445)	67	1.09 (0.81–1.48)	0.550	0.017
Women (n = 476)	26	2.14 (1.31–3.50)	0.002	

N SBI: number of participants with silent brain infarcts, OR: Odds ratio, CI: Confidence Interval, SD: standard deviation (46.9 nmol/mL/min). Covariates are: Age, gender, dyslipidemia, diastolic blood pressure, diabetes, current smoking, total cholesterol and statin treatment, the presence of established CVD, Lp-PLA₂ activity and interaction terms between Lp-PLA₂ activity and gender. Associations with p-value <0.05 are represented in bold.

risk factors, cardiovascular disease and lipid-lowering treatments. The role of Lp-PLA₂ testing to assess the risk of clinical cardiovascular events and stroke is well documented [15]. Also some evidences support an association of Lp-PLA₂ with the progression of subclinical atherosclerotic disease, such as those reported by Liu and collaborators [28], who found Lp-PLA₂ activity related to the progression of carotid disease in men. In contrast, the relationship between Lp-PLA₂ and silent ischemic damage in the brain is less known. A previous report showed that Lp-PLA₂ mass and other inflammatory biomarkers were increased in white matter lesions, which also reflect ischemic brain disease, subclinical in most cases [14]. Although the primary analysis in this study was restricted to subjects without SBIs, these results were not changed after including them in the analysis.

Also, in the Rotterdam Scan Study, Lp-PLA₂ activity was associated with an increased retinal venular diameter, considered another marker of cerebral small vessel disease [20,29].

Our results point to an association between Lp-PLA₂ activity and silent brain infarcts, but that association was limited to women. Although these results are somewhat intriguing, it has to be considered that Lp-PLA₂ levels may differ between both genders by about 10%, as it has been reported in a systematic review of the

literature comprising more than 500 participants [30]. In our case, this difference was even greater and reached almost 19%.

Moreover, interactions between gender and inflammatory markers, as we found, have been described before by others [13] for interleukin-6 and WML or CSF volumes as outcomes, and also for Lp-PLA₂ activity and carotid disease progression [28]. In contrast to our results, Wright and collaborators did not find any interaction between gender and Lp-PLA₂ for white matter lesions volumes [14], although they measure Lp-PLA₂ mass, instead of Lp-PLA₂ activity as we did. Since stroke is the leading cause of death in women in our country, these results merit further replication in other cohorts and extension to other MRI outcomes.

Finally, despite of the association between Lp-PLA₂ activity and SBIs in women, we failed to demonstrate any significant improvement after its addition to clinical parameters for the discrimination of SBIs. Therefore, although the use of a blood biomarkers as Lp-PLA₂ activity for the identification of SBIs in women might be potentially useful to enable the selection of high risk individuals for intervention trials in prevention, further studies are needed, preferably with a prospective design and assessment of stroke and dementia as endpoints.

This study has some limitations. Although it is described that Lp-PLA₂ is stable over time [31], our results are based on a single measurement at baseline, and might not be reflecting levels at other times, particularly in the context of active inflammatory diseases. Therefore, the design of future studies should preferably include serial determinations. Also, although some studies have shown that the correlation of Lp-PLA₂ activity with other systemic inflammatory markers might be weak [32], and that Lp-PLA₂ reflects more local than systemic inflammation [29], further studies need to assess the predictive role of Lp-PLA₂ activity together with other known inflammatory biomarkers to determine whether they jointly add complementary information in the prediction for SBIs.

From a medical point of view, Lp-PLA₂ activity might potentially help in the identification of women with silent brain infarcts and at higher risk of stroke in which new preventive strategies might be tested in properly designed clinical trials in order to diminish the burden associated with this devastating disease.

Sources of funding

This research has been funded with grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI10/0705, CM10/00063 and CP09/136), the Catalanian Society of Hypertension, the Càtedra-UAB Novartis de Medicina de Família and IDIAP Jordi Gol. Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005).

Disclosures

None.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Authors are grateful to all participants and ISSYS Investigators. Lp-PLA₂ assays were kindly donated by diaDexus.

References

- [1] S.E. Vermeer, W.T. Longstreth Jr., P.J. Koudstaal, Silent brain infarcts: a systematic review, *Lancet Neurol.* 6 (2007) 611–619.

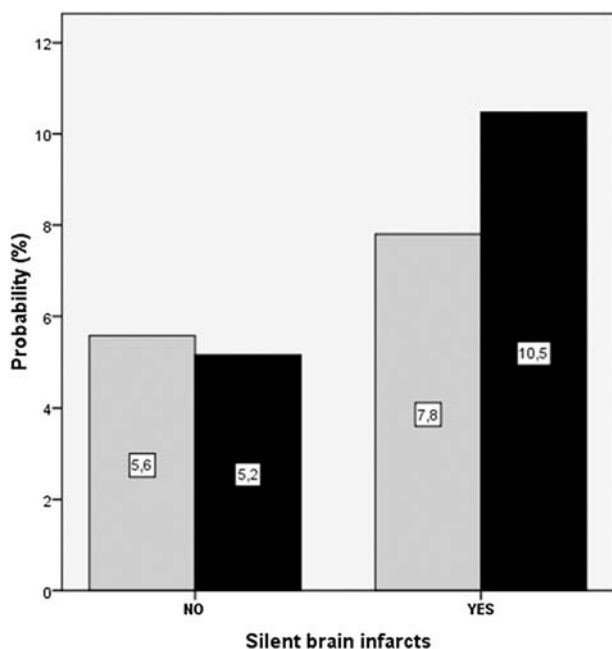


Fig. 2. Graphical representation of Integrated Discrimination Improvement Index. Bars show the probability (%) for each predictive model (gray = clinical model; black = clinical model plus Lp-PLA₂ activity) for women with and without SBIs.

- [2] R.L. Sacco, S.E. Kasner, J.P. Broderick, L.R. Caplan, J.J. Connors, A. Culebras, M.S. Elkind, M.G. George, A.D. Hamdan, R.T. Higashida, B.L. Hoh, L.S. Janis, C.S. Kase, D.O. Kleindorfer, J.M. Lee, M.E. Moseley, E.D. Peterson, T.N. Turan, A.L. Valderrama, H.V. Vinters, An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association, *Stroke* 44 (2013) 2064–2089.
- [3] R.T. Dada, M. Fornage, S.S. Virani, V. Nambi, R.C. Hoogeveen, E. Boerwinkle, A. Alonso, R.F. Gottesman, T.H. Mosley, C.M. Ballantyne, Cardiovascular biomarkers and subclinical brain disease in the atherosclerosis risk in communities study, *Stroke* 44 (2013) 1803–1808.
- [4] T. Hoshi, K. Kitagawa, H. Yamagami, S. Furukado, H. Hougaku, M. Hori, Relations of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction, *Stroke* 36 (2005) 768–772.
- [5] E.J. van Dijk, N.D. Prins, S.E. Vermeer, H.A. Vrooman, A. Hofman, P.J. Koudstaal, M.M. Breteler, C-reactive protein and cerebral small-vessel disease: the Rotterdam Scan Study, *Circulation* 112 (2005) 900–905.
- [6] R. Schmidt, H. Schmidt, M. Pichler, C. Enzinger, K. Petrovic, K. Niederkorn, S. Horner, S. Ropele, N. Watzinger, M. Schumacher, A. Berghold, G.M. Kostner, F. Fazekas, C-reactive protein, carotid atherosclerosis, and cerebral small-vessel disease: results of the Austrian Stroke Prevention Study, *Stroke* 37 (2006) 2910–2916.
- [7] C. Reitz, K. Berger, M.P. de Maat, M. Stoll, F. Friedrichs, I. Kardys, J.C. Wittteman, M.M. Breteler, CRP gene haplotypes, serum CRP, and cerebral small-vessel disease: the Rotterdam Scan Study and the MEMO Study, *Stroke* 38 (2007) 2356–2359.
- [8] M. Fornage, Y.A. Chiang, E.S. O'Meara, B.M. Psaty, A.P. Reiner, D.S. Siscovick, R.P. Tracy, W.T. Longstreth Jr., Biomarkers of inflammation and MRI-defined small vessel disease of the brain: the cardiovascular health study, *Stroke* 39 (2008) 1952–1959.
- [9] M. Wada, H. Nagasawa, K. Kurita, S. Koyama, S. Arawaka, T. Kawanami, K. Tajima, M. Daimon, T. Kato, Cerebral small vessel disease and C-reactive protein: results of a cross-sectional study in community-based Japanese elderly, *J. Neurol. Sci.* 264 (2008) 43–49.
- [10] B.T. Baune, G. Ponath, M. Roethermundt, A. Roesler, K. Berger, Association between cytokines and cerebral MRI changes in the aging brain, *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 22 (2009) 23–34.
- [11] M. Yoshida, K. Higashi, E. Kobayashi, N. Saeki, K. Wakui, T. Kusaka, H. Takizawa, K. Kashiwado, N. Suzuki, K. Fukuda, T. Nakamura, S. Watanabe, K. Tada, Y. Machi, M. Mizoi, T. Toida, T. Kanzaki, H. Tomitori, K. Kashiwagi, K. Igarashi, Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP, *Atherosclerosis* 211 (2010) 475–479.
- [12] A.L. Jefferson, J.M. Massaro, P.A. Wolf, S. Seshadri, R. Au, R.S. Vasan, M.G. Larson, J.B. Meigs, J.F. Keane Jr., I. Lipinska, S. Kathiresan, E.J. Benjamin, C. DeCarli, Inflammatory biomarkers are associated with total brain volume: the Framingham Heart Study, *Neurology* 68 (2007) 1032–1038.
- [13] C.L. Satizabal, Y.C. Zhu, B. Mazoyer, C. Dufouil, C. Tzourio, Circulating IL-6 and CRP are associated with MRI findings in the elderly: the 3C-Dijon Study, *Neurology* 78 (2012) 720–727.
- [14] C.B. Wright, Y. Moon, M.C. Paik, T.R. Brown, L. Rabbani, M. Yoshita, C. DeCarli, R. Sacco, M.S. Elkind, Inflammatory biomarkers of vascular risk as correlates of leukoariosis, *Stroke* 40 (2009) 3466–3471.
- [15] Lp-PLA(2) Studies Collaboration, A. Thompson, P. Gao, L. Orfei, S. Watson, E. Di Angelantonio, S. Kaptoge, C. Ballantyne, C.P. Cannon, M. Criqui, M. Cushman, A. Hofman, C. Packard, S.G. Thompson, R. Collins, J. Danesh, Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and risk of coronary disease, stroke and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies, *Lancet* 375 (2010) 1536–1544.
- [16] M.S. Elkind, W. Tai, K. Coates, M.C. Paik, R.L. Sacco, Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity and risk of recurrent stroke, *Cerebrovasc. Dis.* 27 (2009) 42–50.
- [17] P. Delgado, P. Chacón, A. Penalba, D. Pelegri, T. García-Berrocso, D. Giral, E. Santamarina, M. Ribó, O. Maisterra, J. Alvarez-Sabín, A. Rosell, J. Montaner, Lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity is associated with large-artery atherosclerotic etiology and recurrent stroke in TIA patients, *Cerebrovasc. Dis.* 33 (2012) 150–158.
- [18] A. Massot, D. Pelegri, A. Penalba, J. Arenillas, C. Boada, D. Giral, M. Ribó, C.A. Molina, A. Rosell, J. Alvarez-Sabín, P. Chacón, A. Rovira, P. Delgado, J. Montaner, Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease, *Atherosclerosis* 218 (2011) 181–187.
- [19] M. Katan, Y.P. Moon, M.C. Paik, R.L. Wolfert, R.L. Sacco, M.S. Elkind, Lipoprotein-associated phospholipase A2 is associated with atherosclerotic stroke risk: the Northern Manhattan Study, *PLoS One* 9 (2014) e83393.
- [20] F.J. De Jong, M.K. Ikram, J.C. Wittteman, A. Hofman, P.T. de Jong, M.M. Breteler, Retinal vessel diameters and the role of inflammation in cerebrovascular disease, *Ann. Neurol.* 61 (2007) 491–495.
- [21] I. Riba-Llena, C.I. Jarca, X. Mundet, J.L. Tovar, F. Orfila, A. López-Rueda, C. Nafria, J.L. Fernández, X. Castañé, M. Domingo, J. Alvarez-Sabín, I. Fernández-Cortiñas, O. Maisterra, J. Montaner, P. Delgado, Investigating silent strokes in hypertensives: a magnetic resonance imaging study (ISSYS): rationale and protocol design, *BMC Neurol.* 13 (2013) 130.
- [22] P. Delgado, I. Riba-Llena, J.L. Tovar, C.I. Jarca, X. Mundet, A. López-Rueda, F. Orfila, J. Llussà, J.M. Manresa, J. Alvarez-Sabín, C. Nafria, J.L. Fernández, O. Maisterra, J. Montaner, Prevalence and associated factors of silent brain infarcts in a Mediterranean cohort of hypertensives, *Hypertension* 64 (2014) 658–663.
- [23] J. Marrugat, J. Vila, J.M. Baena-Díez, M. Grau, J. Sala, R. Ramos, I. Subirana, M. Fitó, R. Elosua, Relative validity of the 10-year cardiovascular risk estimate in a population cohort of the REGICOR study, *Rev. Esp. Cardiol.* 64 (2011) 385–394.
- [24] G. Mancia, G. De Backer, A. Dominiczak, R. Cifkova, R. Fagard, G. Germano, G. Grassi, A.M. Heagerty, S.E. Kjeldsen, S. Laurent, K. Narkiewicz, L. Rulope, A. Rynkiewicz, R.E. Schmieder, H.A. Struijker Boudier, A. Zanchetti, A. Vahanian, J. Camm, R. De Caterina, V. Dean, K. Dickstein, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, I. Hellemans, S.D. Kristensen, K. McGregor, U. Sechtem, S. Silber, M. Tendera, P. Widimsky, J.L. Zamorano, S.E. Kjeldsen, S. Erdine, K. Narkiewicz, W. Kiowski, E. Agabiti-Rosei, E. Ambrosioni, R. Cifkova, A. Dominiczak, R. Fagard, A.M. Heagerty, S. Laurent, L.H. Lindholm, G. Mancia, A. Manolis, P.M. Nilsson, J. Redon, R.E. Schmieder, H.A. Struijker-Boudier, M. Viigimaa, G. Filippatos, S. Adamopoulos, E. Agabiti-Rosei, E. Ambrosioni, V. Bertomeo, D. Clement, S. Erdine, C. Farsang, D. Gaita, W. Kiowski, G. Lip, J.M. Mallion, A.J. Manolis, P.M. Nilsson, E. O'Brien, P. Ponikowski, J. Redon, F. Ruschitzka, J. Tamargo, P. van Zwieten, M. Viigimaa, B. Waeber, B. Williams, J.L. Zamorano, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology, 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC), *Eur. Heart J.* 28 (2007) 1462–1536.
- [25] Y.C. Zhu, C. Dufouil, C. Tzourio, H. Chabriet, Silent brain infarcts: a review of MRI diagnostic criteria, *Stroke* 42 (2011) 1140–1145.
- [26] H. Callanan, A.S. Jaffe, A.K. Saenger, Performance evaluation of an automated assay for lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) activity, *Clin. Chem.* 59 (2013) A266.
- [27] E.R. DeLong, D.M. DeLong, D.L. Clarke-Pearson, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics* 44 (1988) 837–845.
- [28] J. Liu, W. Wang, Y. Qi, Q. Yong, G. Zhou, M. Wang, J. Sun, J. Liu, Z. Jia, D. Zhao, Association between the lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and the progression of subclinical atherosclerosis, *J. Atheroscler. Thromb.* 21 (2014) 532–542.
- [29] M.K. Ikram, F.J. De Jong, E.J. Van Dijk, N.D. Prins, A. Hofman, M.M. Breteler, P.T. De Jong, Retinal vessel diameters and cerebral small vessel disease: the Rotterdam Scan Study, *Brain* 129 (2006) 182–188.
- [30] J. Gregson, H.A. Stirnadel-Farrant, I.U. Doobaree, C. Koro, Variation of lipoprotein associated phospholipase A2 across demographic characteristics and cardiovascular risk factors: a systematic review of the literature, *Atherosclerosis* 225 (2012) 11–21.
- [31] M.S. Elkind, V. Leon, Y.P. Moon, M.C. Paik, R.L. Sacco, High-sensitivity C-reactive protein and lipoprotein-associated phospholipase A2 stability before and after stroke and myocardial infarction, *Stroke* 40 (2009) 3233–3237.
- [32] J.F. Ferguson, C.C. Hinkle, N.N. Mehta, R. Bagheri, S.L. Derohannessian, R. Shah, M.I. Mucksavage, J.P. Bradfield, H. Hakonarson, X. Wang, S.R. Master, D.J. Rader, M. Li, M.P. Reilly, Translational studies of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in inflammation and atherosclerosis, *J. Am. Coll. Cardiol.* 59 (2012) 764–772.

N-glycome profile levels relate to silent brain infarcts in a cohort of hypertensives
[J Am Heart Assoc.](#) 2015 Nov 23; 4 (11)

N-glycome Profile Levels Relate to Silent Brain Infarcts in a Cohort of Hypertensives

Andrea Vilar-Bergua, MSc; Iolanda Riba-Llena, MD, PhD; Valerie Vanhooren, PhD; Sylviane Dewaele; Claude Libert, PhD; Anna Penalba; Joan Montaner, MD, PhD; Pilar Delgado, MD, PhD

Background—Silent brain infarcts (SBIs) are highly prevalent in the aged population and relate to the occurrence of further stroke and dementia. Serum N-glycome levels have been previously associated with aging and they might be related as well to the presence of SBIs and age-related white matter hyperintensities.

Methods and Results—We determined the serum N-glycome profile in a cohort study comprising 972 subjects and evaluated the relationship between N-glycome levels and the presence and number of SBIs and with age-related white matter hyperintensities grades, assessed by brain magnetic resonance imaging. Decreasing concentrations of biglacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan and increasing concentrations of branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan remained as independent predictors of SBIs (odds ratio 0.4, 95% CI 0.3–0.7 and odds ratio 1.8, 95% CI 1–3.2, respectively), after controlling for the presence of age and classic vascular risk factors. A similar pattern was found to be related to an increasing number of SBIs and white matter hyperintensities grade.

Conclusions—N-glycome levels might be potentially useful as biomarkers for the presence of silent cerebrovascular disease. (*J Am Heart Assoc.* 2015;4:e002669 doi: 10.1161/JAHA.115.002669)

Key Words: aging • biomarker • N-glycome profile • silent brain infarct • white matter hyperintensities

The term “silent brain infarcts” (SBIs) refers to cerebral infarcts that are found incidentally on neuroimaging, particularly brain magnetic resonance imaging (MRI), in the absence of symptoms suggesting a corresponding stroke event. The majority of SBIs are truly silent, but they can also be associated with subtle symptoms, neurological abnormalities, and cognitive impairment. More importantly, individuals with SBIs have a 2- to 4-fold higher risk of having a future stroke or dementia than patients without them, independently of the presence of other vascular risk factors. Thus, they may also be referred to as “covert infarcts” or “MRI-defined

infarcts,” rather than “silent.” Their prevalence in population-based studies ranges from 8% to 28% of healthy individuals. They are 5 times more frequent than stroke and therefore they constitute a significant burden of brain vascular disease.¹ The majority of silent brain infarcts are lacunar infarcts and they usually coexist with other markers of cerebral small vessel disease, as white matter hyperintensities (WMHs).²

Age is the more clearly identified risk factor for SBIs, and according to a systematic review, the odds ratio for prevalent SBIs assessed per year of age ranges from 1.03 to 1.13 (or from 2.44–3.21 per decade). As a consequence, and given the progressive aging of the population in developed countries, the prevalence and consequences of SBIs are expected to reach epidemic proportions in the near future. Despite these numbers, their systematic screening is not recommended (brain MRI is expensive and its availability is limited in some settings). The use of plasma biomarkers for their identification could potentially overcome these limitations and help clinicians to establish preventive treatments to decrease the burden of stroke and dementia.

We have previously shown that urine albumin-to-creatinine ratio (or microalbuminuria) and lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) are associated with the risk of SBIs in hypertensive individuals. Subjects with microalbuminuria had twice the odds of SBIs, while Lp-PLA₂ activity was also associated with the presence of SBIs, but only in women.^{3,4}

From the Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain (A.V.-B., I.R.-L., A.P., J.M., P.D.); Stroke Unit, Neurology Department, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain (J.M.); Inflammation Research Center, UGent-VIB Research Building FSVM, Ghent, Belgium (V.V., S.D., C.L.); Biomedical Molecular Biology Department, Ghent University, Ghent, Belgium (V.V., S.D., C.L.).

Correspondence to: Pilar Delgado, MD, PhD, Neurovascular Research Lab, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: pilar.delgado@vhir.org
Received September 23, 2015; accepted November 1, 2015.

© 2015 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley Blackwell. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Other potentially interesting candidate biomarkers would be N-glycans. N-glycans are oligosaccharide structures covalently linked (sugar–amino acid linkage) to an asparagine residue of a protein in a consensus sequence (GlcNAc- β -Asn). These sugar structures are highly heterogeneous and their biosynthesis is closely linked to the cellular metabolism, thereby they reflect the metabolic status of cells. They were first described in relation to aging in 1988, when their profile in plasma G immunoglobulins were studied in a group of 151 subjects.⁵ Later on, the entire serum N-glycome was investigated and a consistent pattern of changes in the N-glycan structures related to age was described within different European and Asian populations.^{6,7} N-glycome levels have also been described in relation to neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease.^{8,9}

In the present study, we hypothesized that the serum glycome profile might reflect “brain aging” as well, and could be helpful for the identification of SBIs or other silent brain vascular lesions, such as WMHs.

Specifically in this study, we evaluated whether the serum N-glycome relates to SBIs (and WMHs) and additionally, we assessed their predictive value independently of other clinical parameters and previously described biological markers to detect SBIs in a large cohort of stroke-free individuals.

Methods

Study Population

Subjects for this study are those included within the ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives: a magnetic resonance imaging Study). The basic design of this study is a cohort study in a randomly selected sample of 976 hypertensive individuals, aged 50 to 70 years old, with no history of previous clinical stroke or dementia. This study is aimed to determine the prevalence of silent brain infarcts and to assess their determinants. All participants were recruited in the city of Barcelona. A stratified randomization method was used to control for age, sex, and the center from which the subjects were recruited. Additional details on subject selection and baseline procedures have been published elsewhere.^{4,10}

Participants with prior stroke were excluded after it was confirmed by medical records and in those reporting suggestive stroke symptoms, according to the Stroke Symptom questionnaire.¹¹ Other exclusion criteria were (1) impossibility to undergo a brain MRI (ie, patients carrying pacemakers, cochlear stimulators, etc), (2) suspected white coat hypertension syndrome, and (3) short-term life expectancy preventing follow-up examinations.

On baseline, clinical data were collected, including demographic and personal medical history, and the presence of vascular risk factors or an established cardiovascular disease.

Systolic and diastolic office BP was measured with an oscillometric device (Omron M6 Comfort), and the mean of the last 2 of 3 determinations after 5-minute rest was recorded. Diabetes mellitus was defined as fasting glucose levels over 7 mmol/L and/or the use of oral antidiabetic drugs or insulin. Smoking habit was collected and categorized into current, former, or never. Alcohol abuse was defined as intake of at least 280 g/week in males and 170 g/week in females. Body mass index was calculated as weight (kg) divided by height squared (m^2). Coronary artery disease was recorded in participants with history of angina, myocardial infarction, or in those who underwent percutaneous coronary interventions or coronary artery bypass graft. Previous cardiovascular disease included coronary artery disease and peripheral artery disease (intermittent claudication, bypass surgery, aortic aneurysm).

This study was approved by our local institutional review Ethics Committee, and all subjects gave their informed consent to participate prior to the inclusion.

Brain MRI

A brain MRI with a pre-established data acquisition protocol was performed within the next month after study entry. All examinations were performed with the same 1.5 Tesla MR (Signa HDx 1.5, General Electrics, Waukesha, WI), including axial T1, T2, and fluid-attenuated inversion recovery weighted images.

SBIs were defined as previously,¹² as lesions of ≥ 3 mm in their widest diameter, with cerebrospinal fluid–like signal characteristics in all pulse sequences, and with a hyperintense rim surrounding the lesion in fluid-attenuated inversion recovery MRI. These lesions were differentiated from enlarged perivascular spaces based on their size, shape, and location. SBIs were dichotomized into 2 categories (present/absent) and also the number of SBIs was considered in our study.

WMHs were rated at fluid-attenuated inversion recovery and defined as extensive or focal lesions that appeared as hyperintense lesions in the white matter (WM). They were graded in the subcortical deep WM and in periventricular regions, according to the Fazekas scale.¹³ For the analysis we considered WMHs as significant when lesions scored at least 2 points in this scale in the periventricular regions (ie, smooth halo or irregular lesions extending into the deep WM) or deep WM (ie, beginning of confluent foci or large confluent areas).

All images were primarily assessed by 2 neuroradiologists and in a second term by the same readers plus an experienced stroke neurologist. They were blinded to laboratory measurements and clinical data. Intrarater agreement was calculated for each reader in a training set before undertaking the present reading. Both intra- and inter-rater agreement between different observers and imaging features

ranged from 0.60 to 0.75. Disagreements in assessments were solved by consensus. Representative examples of these MRI features are shown in Figure 1.

N-glycome Profile Assessment

On the baseline visit of the ISSYS study, blood samples were obtained in all participants. Peripheral venous samples were collected in tubes with no anticoagulant and serum was extracted after 15-minute centrifugation (1500 *g*) and then frozen at -80°C until the test was performed.

N-glycan profiles were generated from 2- μL serum samples by DSA-FACE (DNA Sequencer Adapted-Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis) technology using a capillary electrophoresis (CE)-based ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Samples were only tested once since the intra- and interassay coefficients of variation of the glycan analyses have been reported previously to be $<5\%$.⁶ Results are normalized values from peaks 1 to 9, which represent relative concentrations of the oligosaccharides that are more prominent in humans. Briefly, the corresponding structures are as follows: peak 1 corresponds to agalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan (NGA2F); peak 2, to agalacto core- α -1,6-fucosylated bisecting biantennary glycan (NGA2FB); peak 3 and peak 4 to single agalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycans (NG1A2F); peak 5, to bigalacto biantennary glycan (NA2); peak 6, to bigalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan (NA2F); peak 7, to bigalacto core- α -1,6-fucosylated bisecting biantennary glycan (NA2FB); peak 8, to triantennary glycan (NA3); and peak 9, to branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan (NA3Fb).⁷ (Figure 2).

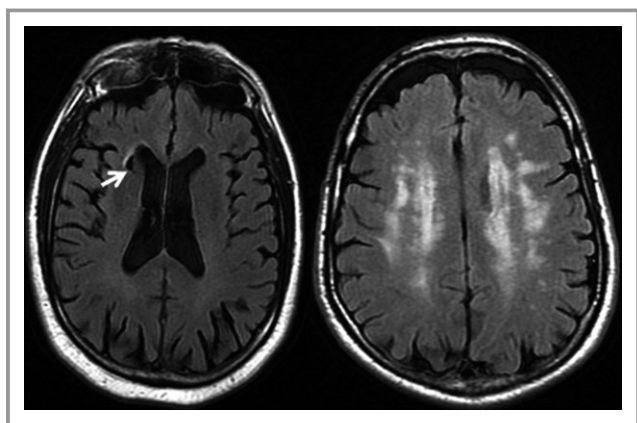


Figure 1. Representative examples of imaging markers of cerebral small-vessel disease. From left to right: Brain infarct affecting caudate nuclei is shown by a white arrow (FLAIR MRI), extensive white matter changes (FLAIR MRI), 1.5 Tesla MR (Signa HDx 1.5; General Electric, Waukesha, WI). FLAIR indicates fluid-attenuated inversion recovery; MRI, magnetic resonance imaging.

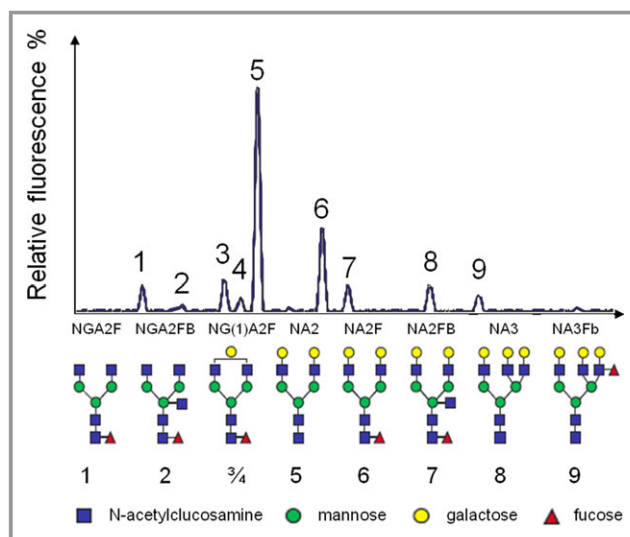


Figure 2. Typical human serum N-glycome profile, and structural formulas of N-glycans. Peak 1 is an agalactosylated, core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan (NGA2F), peak 2 is an agalactosylated, core- α -1,6-fucosylated bisecting biantennary glycan (NGA2FB), peaks 3 and 4 are monogalactosylated, core- α -1,6-fucosylated biantennary (NG1A2F), peak 5 is a bigalactosylated, biantennary glycan (NA2), peak 6 is a bigalactosylated, core- α -1,6-fucosylated biantennary (NA2F), peak 7 is a galactosylated, core- α -1,6-fucosylated bisecting biantennary (NA2FB), peak 8 is a trigalactosylated, tri-antennary (NA3), peak 9 is a branching α -1,3-fucosylated trigalactosylated tri-antennary (NA3Fb) [Lewis X Ag: GlcNac-galactose-fucose].

In the same participants, we assayed serum total and high-density lipoprotein cholesterol (Olympus, Lismeehan, Ireland) and Lp-PLA₂ activity (PLAC test for activity, Diadexus, Inc) using enzyme assays on a single automated clinical chemistry analyzer (Olympus AU 2700). Finally, a single spot urine sample was also collected at the baseline visit and sent to a central laboratory for determining the urinary albumin-to-creatinine ratio.^{3,4} Microalbuminuria was defined as the presence of urinary albumin-to-creatinine ratio higher than 21 mg/g in men and over 30 mg/g in women.¹⁴

Statistical Analyses

For descriptive purposes, normality for continuous variables was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. None of the N-glycans structures was normally distributed in our sample, except NA2. For univariate analysis, continuous variables were compared using *t* test and ANOVA or Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis test when appropriate. Categorical variables were compared using Pearson χ^2 and continuous data were analyzed using Pearson or Spearman correlation, depending on their distribution. We studied how the serum N-glycome profile related to age, to the presence of traditional vascular risk factors, and to the presence/absence of SBIs

and their number (considering 3 categories: none versus single versus multiple).

False discovery rate correction was applied for multiple comparisons and statistical significance was set at P values <0.05 .

To assess for independent associations between N-glycome structures and SBIs, adjusted models were constructed by means of forward stepwise logistic regression analysis including as covariates potential confounders such as age, sex, diastolic blood pressure, diabetes mellitus, tobacco, and high-density lipoprotein cholesterol. Additionally, we added in the models Lp-PLA₂ activity and the presence of microalbuminuria, since both of them have been related to SBIs in our cohort before. Odds ratios and 95% CI will be presented.

To assess the improvement to prediction by adding variables (in this case, the serum N-glycome structures) to a logistic regression model, likelihood ratio tests were used (Using R version 3.1.0 “Spring dance” software [Copyright (C) 2014 The R Foundation for Statistical Computing]).¹⁵ Also, we provided measures of global diagnostic accuracy for SBIs detection (area under the receiver operator curves) of the different models including or not the information on the serum N-glycome and compared them by using the Delong’s method¹⁶ implemented at MedCalc 12.4 software.

Finally, 2 more exploratory analyses were performed. First, we sought associations between serum N-glycome levels and other brain vascular lesions, specifically with the presence of significant WMHs at subcortical deep and periventricular areas. Secondly, we studied whether the N-glycome

correlated with other markers that we previously related to SBIs (microalbuminuria and Lp-PLA₂), both in univariate and adjusted linear regression models (considering as outcomes the changes observed in the N-glycome).

Results

We obtained results on the serum N-glycome profile in almost all participants from the ISSYS study ($n=972$, 99.6%). Median age of the participants was 64 (59–67) years old and 59.4% were males. Other baseline clinical characteristics of the sample are shown in Table 1.

Serum N-glycome Profile, Age, and Vascular Risk Factors

As previously described, several N-glycans were associated with age in this population (NGA2F, NGA2FB, NA2F, and NA3). Specifically, a weak positive correlation was observed with age for NGA2F and NGA2FB ($r=0.14$, $P<0.001$ and $r=0.17$, $P<0.001$, respectively), whereas a negative correlation was found for NA2F and NA3 ($r=-0.12$, $P<0.001$ and $r=-0.06$, $P=0.051$). Also, as described before, age was correlated with the log ratio of NGA2F to NA2F or GlycoAgeTest ($r=0.17$, $P<0.001$) (also named GlycoAgeTest).⁶

Associations between different N-Glycans and demographic and cardiovascular risk factors are shown in Table 2. Significant differences were observed among some of the peaks regarding sex, vascular risk factors such as diabetes, dyslipidemia, and tobacco and alcohol intake. Moreover, some

Table 1. Description of Demographic and Clinical Baseline Factors in the Total Sample and in Those With or Without SBIs

	Included Patients (n=972)	Absence of SBI (n=874)	Presence of SBI (n=98)	P Value
Age, y	64 (59–67)	64 (58–67)	65 (62–68)	0.001
Sex, female	50.5%	53%	28.6%	<0.001
Diabetes mellitus	23.5%	22.8%	29.6%	0.13
HDL cholesterol	47.5 (40–57)	47.9 (40.3–57.4)	44.6 (39–51.9)	<0.001
Mean SBP, mm Hg	142 (132–153)	142 (132–153)	142 (131–152)	0.76
Mean DBP, mm Hg	78±9	78±9	80±10	0.02
Tobacco use	15.1%	15.3%	13.3%	0.59
Alcohol abuse	6.5%	6.7%	4.8%	0.79
Any established CVD	12.3%	11.2%	22.4%	0.001
CAD	6.7%	8.7%	18.6%	0.002
LpPLA ₂ activity, nmol/mL per minute	181 (153–215)	179 (151–215)	195.5 (158–232)	0.03
Microalbuminuria	12.9%	11.5%	26.4%	<0.001

Data are expressed in median (interquartile range), mean±SD, and percentage as appropriate. CAD indicates coronary artery disease; CVD, cardiovascular disease; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high-density lipoproteins; Lp-PLA₂, lipoprotein-associated phospholipase A₂; SBI, silent brain infarct; SBP, systolic blood pressure.

Table 2. Relations Between Age, Vascular Risk Factors, and Serum N-glycans

Characteristics	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8	Peak 9
Age	$R=0.145$ $P<0.001^\dagger$	$R=0.168$ $P<0.001^\dagger$	$R=0.020$ $P=0.527$	$R=-0.035$ $P=0.273$	$R=0.001$ $P=0.695$	$R=-0.122$ $P<0.001^\dagger$	$R=-0.032$ $P=0.316$	$R=-0.059$ $P=0.069$	$R=-0.019$ $P=0.563$
Sex									
Women	9.7 (7.8–11.8) ^{***†}	1.8 (1.5–2.3) ^{***†}	6 (5.2–7)	4.6 (4–5.2)	41.5±4.3	17.1 (15.7–18.6)	6 (5.2–7)	8 (6.3–9.3) ^{***†}	2.1 (1.4–2.9)
Men	9.1 (7.4–11.5)	1.7 (1.4–2.2)	6.1 (5.2–7)	4.8 (4.1–5.4) ^{***†}	41.7±4.5	17.9 (16.5–19.7) ^{***†}	6.2 (5.3–7.2)	6.6 (5.4–8)	2.9 (2.1–4) ^{***†}
Diabetes									
No	9.5 (7.7–1.2)	1.8 (1.4–2.2)	6.4 (5.3–7) ^{***†}	4.7 (4.1–5.4) ^{***†}	41.5±4.3	17.5 (16–19.2)	6.1 (5.3–7.1)	7.2 (5.9–8.8)	2.6 (1.7–3.6) ^{**}
Yes	9.5 (7.7–1.2)	2 (1.5–2.4) ^{***†}	5.5 (4.9–6.5)	4.4 (3.9–5.1)	41.8 ±4.7	18 (16–19.2)	6.2 (5.3–7.3)	7.6 (6.3–9)	2.3 (1.7–3.2)
HDL	$R=0.021$ $P=0.516$	$R=-0.017$ $P=0.603$	$R=0.046$ $P=0.185$	$R=-0.031$ $P=0.343$	$R=0.017$ $P=0.589$	$R=-0.044$ $P=0.171$	$R=0.036$ $P=0.259$	$R=0.106$ $P<0.001^\dagger$	$R=-0.167$ $P<0.001^\dagger$
Active smoker									
No	9.7 (7.8–11.7) ^{***†}	1.8 (1.5–2.3)	6.1 (5.2–7) ^{***†}	4.7 (4.1–5.4) ^{***†}	41.2±4.3	17.6 (16.2–19.3) ^{***†}	6 (5.2–7)	7.3 (6.1–8.9)	2.3 (1.6–3.3)
Yes	8.3 (6.8–10.5)	1.8 (1.5–2.3)	4.8 (5.5–6.3)	4.2 (3.8–4.8)	43.4±4.4 ^{***†}	16.5 (15.2–18)	6.4 (5.5–7.3) ^{***†}	7.1 (6.4–8.5)	3.5 (2.6–4.7) ^{***†}
Alcohol abuse									
No	9.2 (7.6–1.1)	1.8 (1.5–2.3)	6 (5.2–6.9)	4.8 (4.1–5.4)	41.7±4.4	17.5 (16–19.2)	6.3 (5.3–7.2)	7 (5.8–8.5)	2.7 (1.9–3.6)
Yes	9 (7.3–1.1)	1.8 (1.5–2.1)	5.5 (5–6.6)	4.5 (4–4.9)	42±4.2	17.7 (16–19.5)	6.3 (5.8–7.2)	7.9 (6.4–9.3)	3.4 (2.5–4.1) ^{**}
BMI, kg/m ²	$R=0.124$ $P<0.001^\dagger$	$R=0.112$ $P<0.001^\dagger$	$R=0.069$ $P=0.035$	$R=-0.008$ $P=0.802$	$R=-0.057$ $P=0.078$	$R=-0.068$ $P=0.037$	$R=-0.023$ $P=0.480$	$R=0.069$ $P=0.034$	$R=-0.022$ $P=0.492$
CAD									
No	9.5 (7.7–11.6)	1.8 (1.5–2.3)	6 (5.2–7)	4.7 (4.1–5.4)	41.6±4.3	17.5 (16–19.3)	6.1 (5.2–7.1)	7.3 (6–8.9)	2.6 (1.7–3.6)
Yes	9.2 (7.7–11.4)	1.8 (1.5–2.2)	6.2 (5.2–6.9)	4.7 (4.1–5.4)	41.5±5	17.9 (16.6–19.5)	6.2 (5.3–7.5)	7.1 (5.7–8.5)	2.4 (1.7–3.3)
Any established CVD									
No	9.5 (7.7–1.7)	1.8 (1.5–2.3)	6.1 (5.2–7)	4.7 (4.1–5.4)	41.5±4.4	17.5 (16–19.3)	6 (5–7)	7.3 (6–8.9)	2.6 (1.7–3.6)
Yes	9.17 (7.7–1.1)	1.8 (1.6–2.2)	5.9 (5.2–6.7)	4.6 (4–5.3)	42±4.8	17.7 (16.4–19.3)	6.3 (5.4–7.5) [*]	7.1 (5.8–8.4)	2.5 (1.8–3.5)

Cells show *P* values for the association between each N-glycan structure and baseline characteristics. For age, body mass index and waist circumference, correlation coefficients (*r*) are also shown. BMI indicates body mass index; waist circumference is expressed in centimeters; CAD, coronary artery disease; CVD, cardiovascular disease; HDL, high-density lipoproteins. ^{*}*P*<0.050; ^{**}*P*<0.010, [†]associations that remained significant after False Discovery Rate correction.

peaks were associated with obesity measurements such as body mass index or waist circumference.

Serum N-glycome Profile and SBIs

From all participants with valid data on serum N-glycome, 98 subjects presented 1 or more SBIs on MRI (10.1%). Among all factors associated with SBIs in the univariate analysis (Table 1) and as reported before,⁴ age, male sex, and the presence of microalbuminuria were independent predictors of SBIs in our sample.

Regarding the serum N-glycome, we found that NA2F and NA3Fb were associated in opposite directions with the presence of SBIs, as shown in Figure 3A. NA2F and NA3Fb were also associated with the multiplicity of SBI (comparing none, single infarct, and multiple infarcts) as shown in

Figure 3B. Furthermore, in order to evaluate whether these associations were independent of age, the presence of other risk factors, and potential confounders, we performed logistic regression analysis. In order to do so, cutoffs for these peaks were selected based on their sensitivity and specificity on SBIs diagnosis, determined by configuring receiver operator characteristics curves (NA2F \leq 16.66: sensitivity=50%, specificity=67% and NA3Fb \geq 2.11: sensitivity=79.6%, specificity=38.6%). As shown in Table 3, both N-glycan structures remained as independent predictors of SBIs in fully adjusted models, together with increasing age, male sex, increasing diastolic blood pressure, and the presence of microalbuminuria.

Moreover, the addition of these serum N-glycans to the clinical model was significantly associated with an improvement on the prediction of SBIs (χ^2 of the likelihood ratio

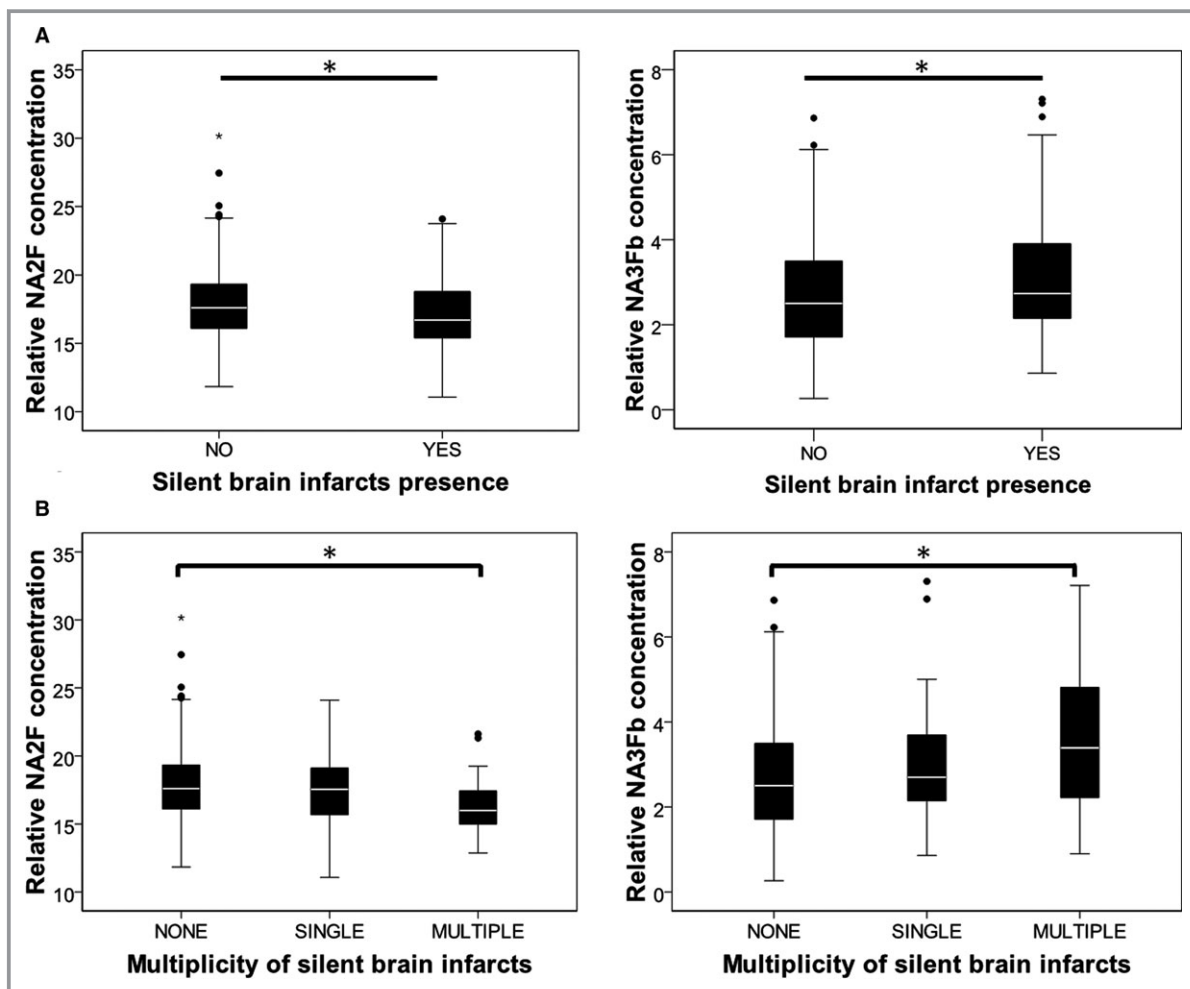


Figure 3. Boxplots representing the relation between NA2F and NA3Fb and the presence (A) and number (B) of SBIs. NA2F: bigalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan; NA3Fb: branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan. * P <0.01. Whiskers were calculated by the formula (Q1-1.5 [interquartile range]) and (Q3-1.5 [interquartile range]). NA2F indicates peak 6, to bigalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan; NA3Fb, peak 9, to branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan; SBIs, silent brain infarcts.

Table 3. Association of N-glycome Structures with SBIs in the Multivariate Analysis

Variables	Model 1	Model 2	Model 3
	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
Age per 1-year increase	1.09 (1.05–1.14)	1.08 (1.03–1.13)	1.08 (1.03–1.13)
Sex, male	2.84 (1.77–4.57)	2.61 (1.58–4.32)	2.5 (1.46–4.28)
Mean office DBP per 1 mm Hg increase	1.03 (1.00–1.05)	ns	1.3 (1.00–1.05)
Microalbuminuria	—	2.50 (1.45–4.31)	1.87 (1.04–3.36)
NA2F \geq 16.657	—	—	0.42 (0.26–0.69)
NA3Fb $>$ 2.1134	—	—	1.81 (1.00–3.28)

Model 1 is adjusted by age, sex, mean (DBP), diabetes, tobacco, and high-density lipoprotein cholesterol. Model 2 is additionally adjusted by microalbuminuria and lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity nmol/mL per minute. Model 3 includes the same covariates as model 2 plus the relative amounts of NA2F and NA3Fb below and above their calculated cutoffs. ns, means office DBP was not included in model 2. DBP indicates diastolic blood pressure; NA2F, peak 6, to bigalacto core- α -1,6-fucosylated biantennary glycan; NA3Fb, peak 9, to branching α -1,3-fucosylated triantennary glycan; OR, odds ratio; SBI, silent brain infarct.

test=11.394, P value <0.001), and with a nonsignificant increase in the global diagnostic accuracy (area under the curve increased from 69.2% to 72.6%, $P=0.083$). The area under the curve of the model containing only clinical variables plus Lp-PLA₂ and the presence of microalbuminuria was also smaller (ie, less predictive capacity) than the fully adjusted model containing the N-glycome structures (area under the curve=70.1%).

Regarding other brain vascular lesions, such as WMH, we found the same N-glycan structures (P value=0.012 for NA2F, and P value=0.015 for NA3Fb) related to the presence of significant WMHs at the periventricular areas, whereas no associations between the serum N-glycome and WMH at deep subcortical areas were observed. In this case, only NA2F remained independently associated with the presence of significant periventricular WMHs (odds ratio considering NA2F \leq 16.66=0.47, from 0.30–0.74, $P=0.001$) together with age (odds ratio per year increase=1.12, 1.07–1.18, $P<0.001$) and the mean diastolic blood pressure (odds ratio per mm Hg increase=1.04, 1.02–1.07, $P=0.001$).

Finally, we conducted an exploratory analysis to evaluate how the biomarkers associated with SBIs in the ISSYS study (Lp-PLA₂ activity, microalbuminuria, and NA2F and NA3Fb) were related to each other. We found that NA3Fb was significantly higher in those with microalbuminuria (2.95 [2.11–3.90] versus 2.49 [1.71–3.48], $P<0.05$), whereas NA2F was positively correlated with Lp-PLA₂ activity (Spearman $R=0.221$, P value<0.001). However, these associations were no longer present after we controlled for age, sex, or smoking habit, suggesting that they were not independent from the existence of vascular risk factors.

Discussion

In this study, we described for the first time that the serum N-glycome relate to the presence of silent brain lesions (SBIs,

WMHs), independently of age and of the presence of vascular risk factors. To our knowledge, this is the first study investigating serum N-glycans as markers of silent cerebrovascular disease. Remarkably, they were independent of age, which is the main risk factor for these conditions, and also from other biological markers, such as the presence of microalbuminuria and Lp-PLA₂ activity levels.

We have described that relative concentrations of N-glycans are related to traditional vascular risk factors in our population. These findings are in agreement with the results from a Croatian population study that reported the relationship of different N-glycans with several vascular risk factors such as age, sex, smoking, lipid levels, and body fat measurements. As in our case, age and vascular risk factors explained only a small amount of the variability in the N-glycan profile, that otherwise has been strongly associated with the genetic background and/or specific physiopathological conditions.¹⁷

An increasing number of studies have investigated the role of blood biomarkers associated with age-related WMHs in the past and a smaller number focused on SBIs, but very few of them have been replicated in other populations thus far.¹⁸ The most well-known biomarkers are related to inflammation and endothelial dysfunction: C-reactive protein,¹⁹ interleukin-6,²⁰ homocysteine,²¹ and urinary albumin-to-creatinine ratio or microalbuminuria.²²

Despite the heterogeneous set of proteins and lipids to which N-glycans structures can be attached, previous reports have described specific patterns in relation to several pathological conditions, such as NA2 for nonalcoholic steatohepatitis,²³ NA2FB for liver cirrhosis,²⁴ NA3Fb for hepatocellular carcinoma²⁵ or NG1A2F for type 2 diabetes mellitus.²⁶

In our study, even though sensitivity and specificity of NA2F and NA3Fb cutoff values were low, they improved prediction of SBIs when added to affordable clinical variables,

but the diagnostic accuracy of these models (72.6%) still needs to be enhanced to be more accurate and useful from a clinical point of view as surrogate. Possibly this can be achieved by combining them with other biological markers involved in different molecular pathways, and including all possible interactions among all biomarkers might also be a key aspect in the analyses. Indeed, the study of several biomarkers contained in a single panel seems to be a promising strategy to diagnose SBIs, as others have reported before. As examples, a panel of biomarkers involving inflammation, hemostasis, neurohormonal activity, and endothelial function was described to be associated with subclinical vascular brain lesions.²⁷ More recently, Shoamanesh and collaborators tested a panel of 15 markers related to systemic inflammation, vascular inflammation, and oxidative stress and found differential associations of these markers with hemorrhagic (cerebral microbleeds) and ischemic (WMHs and SBIs) manifestations of cerebral small vessel disease.²⁸

Interestingly, we found a different N-glycome profile concerning SBIs and WMHs and additionally, N-glycans were only related to periventricular but not deep WMHs. This might be relevant, since it is uncertain whether or not periventricular and deep WMHs differ regarding pathogenesis, risk factors, and clinical consequences.²⁹

Our study has some strengths and limitations. As strengths, it has been performed in a large cohort and we obtained results on serum N-glycans in almost the whole original sample, limiting selection biases. Also, we described the serum N-glycan levels as risk factors for SBIs and other brain vascular lesions such as WMHs and assessed their diagnostic accuracy over clinical features and other previously described biological markers.

This study also has some limitations.

The major sources of N-glycosylated proteins in serum are the B-cells (immunoglobulins), but other cells such as macrophages (cytokines) and other cell types can also contribute. It is well known that small changes in the cell environment can be associated with large changes in the N-glycans produced by a cell type.³⁰ Therefore, the N-glycosylation patterns that we described here associated with SBIs and white matter hyperintensities might be signatures of changes in the structure and function of proteins involved in cerebrovascular disease, suggesting that they could be promising markers to identify specific therapeutic targets and for their future use as biomarkers.

Conclusions

We have measured and described for the first time an association between the serum N-glycome and SBIs in a large cohort of stroke-free individuals. If validated in other samples and combined with other biomarkers in a panel, these

N-glycans could be useful to assess the risk of cerebral small vessel disease in asymptomatic individuals.

Sources of Funding

This research has been cofunded with grants from the ISCIII and FEDER (PI10/0705, PI14/1535, CM10/00063, and CP09/136), from the Catalan Society of Hypertension, the Càtedra-UAB Novartis de Medicina de Família and IDIAP Jordi Gol, from the Fundació Josep Palau Francàs. Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005) (A.V.-B., I.R.-L., A.P., J.M., P.D.); and from FWO Flanders and IUAP, Belspo Belgium (C.L., S.D., and V.V.).

Disclosures

None.

References

1. Vermeer SE, Longstreth WT Jr, Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2007;6:611–619.
2. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2010;9:689–701.
3. Riba-Llena I, Penalba A, Pelegri D, Vilar A, Jarca CI, Filomena J, Montaner J, Delgado P. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 activity for the prediction of silent brain infarcts in women. *Atherosclerosis*. 2014;237:811–815.
4. Delgado P, Riba-Llena I, Tovar JL, Jarca CI, Mundet X, Lopez-Rueda A, Orfila F, Llussa J, Manresa JM, Alvarez-Sabin J, Nafria C, Fernandez JL, Maisterra O, Montaner J. Prevalence and associated factors of silent brain infarcts in a Mediterranean cohort of hypertensives. *Hypertension*. 2014;64:658–663.
5. Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J Exp Med*. 1988;167:1731–1736.
6. Vanhooren V, Dewaele S, Libert C, Engelborghs S, De Deyn PP, Toussaint O, Debacq-Chainiaux F, Poulain M, Glupczynski Y, Franceschi C, Jaspers K, van der Pluijm I, Hoeijmakers J, Chen CC. Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Exp Gerontol*. 2010;45:738–743.
7. Ding N, Nie H, Sun X, Sun W, Qu Y, Liu X, Yao Y, Liang X, Chen CC, Li Y. Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing*. 2011;40:568–575.
8. Hwang H, Zhang J, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER, Jankovic J, Su Z, Hancock AM, Pan C, Montine TJ, Pan S, Nutt J, Albin R, Gearing M, Beyer RP, Shi M, Zhang J. Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. *Mass Spectrom Rev*. 2010;29:79–125.
9. Chen CC, Engelborghs S, Dewaele S, Le Bastard N, Martin JJ, Vanhooren V, Libert C, De Deyn PP. Altered serum glycomics in Alzheimer disease: a potential blood biomarker? *Rejuvenation Res*. 2010;13:439–444.
10. Riba-Llena I, Jarca CI, Mundet X, Tovar JL, Orfila F, Lopez-Rueda A, Nafria C, Fernandez JL, Castane X, Domingo M, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cortinas I, Maisterra O, Montaner J, Delgado P. Investigating silent strokes in hypertensives: a magnetic resonance imaging study (ISSYS): rationale and protocol design. *BMC Neurol*. 2013;13:130.
11. Berger K, Hense HW, Rothdach A, Weltermann B, Keil U. A single question about prior stroke versus a stroke questionnaire to assess stroke prevalence in populations. *Neuroepidemiology*. 2000;19:245–257.
12. Zhu YC, Dufouil C, Tzourio C, Chabriat H. Silent brain infarcts: a review of MRI diagnostic criteria. *Stroke*. 2011;42:1140–1145.
13. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol*. 1987;149:351–356.
14. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R,

- Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, Williams B. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007;25:1105–1187.
15. Vickers AJ, Cronin AM, Begg CB. One statistical test is sufficient for assessing new predictive markers. *BMC Med Res Methodol*. 2011;11:13.
16. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988;44:837–845.
17. Knezevic A, Gornik O, Polasek O, Pucic M, Redzic I, Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*. 2013;20:959–969.
18. Vilar-Bergua A, Riba-Llena I, Nafria C, Bustamante A, Llombart V, Delgado P, Montaner J. Blood and CSF biomarkers in brain subcortical ischemic vascular disease: Involved pathways and clinical applicability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015. doi: 10.1038/jcbfm.2015.68.
19. Anan F, Shimomura T, Kaku T, Kaneda K, Imagawa M, Tsukagawa H, Masaki T, Nawata T, Yonemochi H, Eshima N, Saikawa T, Yoshimatsu H. High-sensitivity C-reactive protein level is a significant risk factor for silent cerebral infarction in patients on hemodialysis. *Metabolism*. 2008;57:66–70.
20. Kikuchi H, Anan F, Kaneda K, Nawata T, Eshima N, Saikawa T, Yoshimatsu H. Interleukin-6 and silent cerebral infarction in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Eur J Neurol*. 2011;18:625–630.
21. Rosenberg GA, Bjerke M, Wallin A. Multimodal markers of inflammation in the subcortical ischemic vascular disease type of vascular cognitive impairment. *Stroke*. 2014;45:1531–1538.
22. Wada M, Nagasawa H, Kurita K, Koyama S, Arawaka S, Kawanami T, Tajima K, Daimon M, Kato T. Microalbuminuria is a risk factor for cerebral small vessel disease in community-based elderly subjects. *J Neurol Sci*. 2007;255:27–34.
23. Chen C, Schmilovitz-Weiss H, Liu XE, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, Braun M, Cohen M, Barak N, Tur-Kaspa R, Vanhooren V, Van Vlierberghe H, Libert C, Contreras R, Ben-Ari Z. Serum protein N-glycans profiling for the discovery of potential biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *J Proteome Res*. 2009;8:463–470.
24. Liu XE, Desmyter L, Gao CF, Laroy W, Dewaele S, Vanhooren V, Wang L, Zhuang H, Callewaert N, Libert C, Contreras R, Chen C. N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus. *Hepatology*. 2007;46:1426–1435.
25. Vanhooren V, Liu XE, Franceschi C, Gao CF, Libert C, Contreras R, Chen C. N-glycan profiles as tools in diagnosis of hepatocellular carcinoma and prediction of healthy human ageing. *Mech Ageing Dev*. 2009;130:92–97.
26. Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, Ceriello A, Genovese S, Spazzafumo L, Borelli V, Bacalini MG, Salvioli S, Garagnani P, Dewaele S, Libert C, Franceschi C. N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS One*. 2015;10:e0119983.
27. Pikula A, Beiser AS, DeCarli C, Himali JJ, Debette S, Au R, Selhub J, Toffler GH, Wang TJ, Meigs JB, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA, Vasani RS, Seshadri S. Multiple biomarkers and risk of clinical and subclinical vascular brain injury: the Framingham Offspring Study. *Circulation*. 2012;125:2100–2107.
28. Shoamanesh A, Preis SR, Beiser AS, Vasani RS, Benjamin EJ, Kase CS, Wolf PA, DeCarli C, Romero JR, Seshadri S. Inflammatory biomarkers, cerebral microbleeds, and small vessel disease: Framingham Heart Study. *Neurology*. 2015;84:825–832.
29. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, Lindley RI, O'Brien JT, Barkhof F, Benavente OR, Black SE, Brayne C, Breteler M, Chabriat H, Decarli C, de Leeuw FE, Doubal F, Duering M, Fox NC, Greenberg S, Hachinski V, Kilimann I, Mok V, Oostenbrugge R, Pantoni L, Speck O, Stephan BC, Teipel S, Viswanathan A, Werring D, Chen C, Smith C, van Buchem M, Norrving B, Gorelick PB, Dichgans M. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol*. 2013;12:822–838.
30. Vanhooren V, Navarrete Santos A, Voutetakis K, Petropoulos I, Libert C, Simm A, Gonos ES, Friguet B. Protein modification and maintenance systems as biomarkers of ageing. *Mech Ageing Dev*. 2015;151:71–84.



N-glycome Profile Levels Relate to Silent Brain Infarcts in a Cohort of Hypertensives
Andrea Vilar-Bergua, Iolanda Riba-Llena, Valerie Vanhooren, Sylviane Dewaele, Claude Libert,
Anna Penalba, Joan Montaner and Pilar Delgado

J Am Heart Assoc. 2015;4:e002669; originally published November 23, 2015;
doi: 10.1161/JAHA.115.002669

The *Journal of the American Heart Association* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue,
Dallas, TX 75231
Online ISSN: 2047-9980

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://jaha.ahajournals.org/content/4/11/e002669>

Subscriptions, Permissions, and Reprints: The *Journal of the American Heart Association* is an online only Open Access publication. Visit the Journal at <http://jaha.ahajournals.org> for more information.