



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](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  
Barcelona 2020

**PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PEQUEÑO VASO CEREBRAL:  
Factores de Riesgo, Mecanismos Implicados y Consecuencias Clínicas**

JOAN JIMÉNEZ-BALADO

---

**Doctorado en Neurociencias**

Universidad Autònoma de Barcelona (UAB)

**Laboratorio de Investigación Neurovascular**

Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR)

---

Directoras:

Dra. PILAR DELGADO MARTÍNEZ

Dra. IOLANDA RIBA-LLENA

Tutor:

Dr. JOSÉ RODRÍGUEZ ÁLVAREZ



Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el laboratorio de investigación Neurovascular del Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR), con el soporte de la beca predoctoral de Gestió d'Ajunts Universitaris i de Recerca (AGAUR) y de la Secretaria de Universidades, de la Generalitat de Catalunya (2017FI\_B\_00064).

El estudio ISSYS se ha financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto Carlos III (EC10/336, CP09/136, PI14/01535, ICI14/307, CP15/00010 y JR15/00032), la Sociedad Catalana de Hipertensión (6ª beca en hipertensión), la Cátedra UAB Novartis de Medicina de Familia y el IDIAP Jordi Gol.

El laboratorio de Investigación Neurovascular forma parte de la red de investigación INVICTUS+ (RD16/0019) y está parcialmente financiado por el Fons de Investigacions Sanitàries (PI15/00354) y co-financiado por el Instituto de Salud Carlos III y el fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



*“Si muestras ocupaciones no nos permiten consagrar a un tema más de dos horas, no abandonaremos el trabajo a pretexto de que necesitaríamos cuatro o seis.”*

**Ramón y Cajal, Reglas y Consejos sobre la Investigación Científica.**

A mi madre,



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Definición y epidemiología</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Etiología y clasificaciones</b>	<b>11</b>
1.2.1. Tipo I: Arterioloesclerosis	12
1.2.2. Tipo II: Angiopatía amiloide cerebral esporádica y hereditaria	13
1.2.3. Tipo III: Causas genéticas no amiloideas	14
1.2.4. Otros tipos de enfermedad de pequeño vaso cerebral	14
<b>1.3. Marcadores radiológicos de la enfermedad de pequeño vaso cerebral</b>	<b>15</b>
1.3.1. Infartos lacunares	15
1.3.2. Lesiones de la sustancia blanca	16
1.3.3. Microsangrados cerebrales	17
1.3.4. Atrofia Cerebral	18
1.3.5. Espacios perivasculares dilatados	20
<b>1.4. Progresión de la enfermedad de pequeño vaso cerebral</b>	<b>23</b>
<b>1.5. Factores de riesgo de la enfermedad de pequeño vaso cerebral</b>	<b>27</b>
1.5.1. Factores de riesgo modificables	27
1.5.1.1. Hipertensión	27
1.5.1.2. Enfermedad Renal Crónica	29
1.5.1.3. Diabetes Mellitus	29
1.5.1.4. Dislipemia	30
1.5.1.5. Obesidad	30
1.5.1.6. Tabaquismo	30
1.5.1.7. Síndrome Metabólico	30
1.5.1.8. Estilo de vida	30
1.5.2. Factores de riesgo no modificables	31
<b>1.6. Mecanismos fisiopatológicos</b>	<b>32</b>
1.6.1. Posibles mecanismos implicados	32
1.6.1.1. Cambios adaptativos	32
1.6.1.2. Daño endotelial	32



1.6.1.3. Ruptura de la barrera hematoencefálica	33
1.6.2. Uso de biomarcadores	34
<b>1.7. Pronóstico de la enfermedad de pequeño vaso cerebral</b>	<b>35</b>
1.7.1. Aumento del riesgo de eventos cardiovasculares	35
1.7.1.1. Ecuaciones de riesgo cardiovascular	36
1.7.2. Aumento del riesgo de demencia	36
1.7.2.1. Definición y epidemiología de la demencia	36
1.7.2.2. Deterioro cognitivo de tipo vascular	38
1.7.2.3. Clasificación del deterioro cognitivo de tipo vascular	39
1.7.2.4. Deterioro cognitivo leve de causa vascular	41
1.7.2.5. Evaluación del deterioro cognitivo de tipo vascular	42
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Estudio ISSYS</b>	<b>49</b>
3.1.1. Objetivos del estudio ISSYS	49
3.1.2. Población	49
3.1.3. Diseño	49
3.1.3.1. Características de las Visitas Presenciales	52
3.1.3.2. Características de las Llamadas telefónicas	54
<b>3.2. Evaluación de la EPVC</b>	<b>54</b>
3.2.1. Evaluación de la EPVC en la visita basal	54
3.2.2. Progresión de la EPVC	55
<b>3.3. Análisis de biomarcadores</b>	<b>57</b>
3.3.1. Fase de descubrimiento	57
3.3.2. Fase de validación	57
<b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
4.1. Cognitive Impact Of Cerebral Small Vessel Disease Changes In Patients With Hypertension	61
4.2. Ambulatory Blood Pressure Levels In The Prediction Of Progression Of Cerebral Small Vessel Disease	75
4.3. Kidney Function And Its Relation With The Progression Of Cerebral Small Vessel Disease And Cognitive Decline	97

4.4. New Biomarker Candidates In The Prediction And Monitoring Of White Matter Hyperintensities Progression	117
4.5. Silent Brain Infarcts, Peripheral Vascular Disease And The Risk Of Cardiovascular Events In Patients With Hypertension	139
4.6. Prevalence Of Hippocampal Enlarged Perivascular Spaces In A Sample Of Patients With Hypertension And Their Relation With Vascular Risk Factors And Cognitive Function	157
<b>SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>165</b>
<b>5.1. Descripción del problema</b>	<b>167</b>
5.1.1. Determinar la progresión radiológica de la enfermedad de pequeño vaso cerebral en población hipertensa española.	167
5.1.2. Observar si la progresión radiológica correlaciona con la evolución cognitiva y la aparición de deterioro cognitivo leve.	169
<b>5.2. Identificación de factores de riesgo, mecanismos o marcadores que permitan monitorizar la evolución de la enfermedad</b>	<b>171</b>
5.2.1. Papel de la monitorización ambulatoria de la presión arterial.	171
5.2.2. Estudiar si el declive de la función renal —determinada por medio de diferentes biomarcadores— es paralelo a la incidencia de lesiones silentes.	173
5.2.3. Analizar el proteoma de pacientes con progresión de las lesiones de la sustancia blanca con el objetivo de descubrir nuevas vías, proteínas y mecanismos implicados en la enfermedad de pequeño vaso cerebral.	174
5.2.4. La predicción de la Enfermedad de Pequeño Vaso Cerebral.	175
<b>5.3. Estudiar el pronóstico de los pacientes con lesiones cerebrovasculares silentes</b>	<b>176</b>
5.3.1. Determinar si existe asociación entre las lesiones de la enfermedad de pequeño vaso cerebral y el riesgo de evento cardiovascular.	176
<b>5.4. Proponer nuevos marcadores radiológicos de la enfermedad de pequeño vaso cerebral</b>	<b>177</b>
5.4.1. Definir la prevalencia de los espacios perivasculares dilatados del hipocampo y observar si se asocian al resto de marcadores radiológicos de la enfermedad.	177
<b>5.5. Estudio ISSYS: Perspectivas, fortalezas y limitaciones</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>185</b>



## RESUMEN

Se calcula que la enfermedad de pequeño vaso cerebral (EPVC) es la causante del 20-25% de los ictus isquémicos y de hasta el 45% de las demencias. Su estudio se realiza principalmente evaluando en resonancia magnética cerebral (RMC) sus consecuencias—las lesiones de la sustancia blanca (LSB), los microsangrados cerebrales, los infartos lacunares y los espacios perivasculares dilatados—.

La EPVC se caracteriza por un largo periodo encubierto en que estos marcadores radiológicos se acumulan en el parénquima cerebral. A pesar de que se conoce la presentación de esta enfermedad, los factores de riesgo y mecanismos implicados en su evolución no son bien conocidos. Tampoco se sabe si ritmos de progresión más marcados se relacionan con peores evoluciones clínicas.

Esta tesis se ha realizado en la cohorte del estudio ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives, a magnetic resonance imaging Study). Esta cohorte está formada por 976 sujetos hipertensos de 50-70 años, sin ictus o demencia previos. En 2010-2012 se les realizó una visita clínica, una RMC, una exploración cognitiva, la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) y se tomaron muestras de sangre y orina. En 2014-2016 se volvió a visitar a 356 pacientes en una visita con las mismas características que la visita basal, lo que nos permitió evaluar la progresión de la EPVC, así como el cambio del resto de variables.

De este modo, hemos visto que la progresión de la EPVC es altamente prevalente en población hipertensa, observando que el 26.2% y el 9.9% de los sujetos presentaron una progresión significativa en 1 y  $\geq 2$  marcadores radiológicos, respectivamente. Esta progresión hemos encontrado que correlaciona con el declive de las funciones cognitivas y con la aparición del diagnóstico de deterioro cognitivo leve — observado en el 9.1% de la muestra—. No obstante, esto dependerá del grado, tipo y localización de las lesiones, siendo la progresión de las LSB periventriculares el marcador más asociado con el empeoramiento cognitivo. Análogamente, mediante estudios de supervivencia en toda la cohorte ( $n=976$ ) hemos constatado que los pacientes con infartos cerebrales silentes tienen un riesgo triplicado de padecer un evento de tipo cardiovascular.

Por otro lado, la MAPA puede ayudar a predecir la aparición de las lesiones, si bien sus valores deberían ser combinados con otras fuentes de información, como los biomarcadores. Así que hemos visto que los marcadores de función renal muestran un declive paralelo a la progresión de la EPVC y al deterioro cognitivo. Por medio de estudios proteómicos hemos propuesto diversas moléculas (MET, MMP9, ASAH-2) que correlacionan con la evolución de las LSB y será interesante seguir estudiando su posible uso clínico y rol en la fisiopatología de las LSB.

Finalmente, hemos evaluado los espacios perivasculares dilatados del hipocampo, y encontrado que se relacionan con otras lesiones de la EPVC y con la cognición. Esto podría indicar que forman parte del conjunto de cambios de la EPVC y que la evaluación de su progresión podría ser un interesante objetivo futuro.



## ABSTRACT

Cerebral small vessel disease may be the cause of up to 20-25% of ischemic strokes and 45% of dementia cases. CSVD is principally studied by assessing its consequences via magnetic resonance imaging (MRI) — white matter hyperintensities (WMH), cerebral microbleeds, lacunar infarcts and enlarged perivascular spaces—.

CSVD presents a long subclinical course in which these markers may accumulate on brain parenchyma. Although we know the radiological markers of cSVD, nowadays the vascular risk factors and implicated mechanisms in their progression are not well understood. Furthermore, it is unknown whether to present a marked progression of cSVD is associated with a worse clinical evolution.

This thesis has been conducted in the ISSYS study (Investigating Silent Strokes in hYpertensives, a magnetic resonance imaging Study). This cohort is composed of 976 patients with hypertension aged 50-70, and dementia and stroke-free. Between 2010 and 2012 they underwent a clinical visit, a MRI, a cognitive evaluation, the ambulatory blood pressure monitoring (ABPM), and a urine and blood sampling collection. Between 2014 and 2016 a sample consisting of 356 subjects underwent a second visit with the same characteristics as at the baseline. In this sample we could evaluate the progression of cSVD, as well as the change in the rest of variables.

Thereby, we observed that the progression of cSVD is a prevalent phenomenon in patients with hypertension. Concretely, 26.2% and 9.9% of subjects showed 1 and  $\geq 2$  incident cSVD lesions over the follow-up, respectively. This progression was correlated with the decline in cognition and incident mild cognitive impairment diagnosis —9.1% of the sample—. However, this relationship depends on the severity of these changes, and the type and localization of the lesion/s. Periventricular WMH was the marker of cSVD which was more significantly associated with cognitive decline. Similarly, by means of a survival analysis conducted in the complete cohort (n=976) we found that patients with silent brain infarcts were at three-fold increased risk of suffer an incident cardiovascular event within 5 years.

On the other hand, ABPM may help to predict the progression of cSVD, although its information should be combined with other variables (e.g., clinical information, blood biomarkers) in order to achieve a clinically significant predictive model. Markers of kidney function (microalbuminuria and estimated glomerular filtration rate) presented a parallel decline with the progression of cSVD and cognitive impairment. Hence, these markers may help to identify patients at risk of progression of cSVD. Moreover, by means of a proteomic study we proposed several proteins which were correlated with the progression of WMH (MET, MMP9, ASAH-2). Therefore, to study the clinical usefulness of these molecules in future studies, as well as their role in the pathophysiology of WMH, may be of greater interest.

Finally, we assessed the burden of hippocampal enlarged perivascular spaces in the sample. We found that these radiological markers were related to other cSVD lesions and to cognitive performance. These results may indicate that hippocampal enlarged perivascular spaces are part of cSVD manifestations. Hence, further research should determine their progression in additional longitudinal studies.



## ABREVIATURAS

ABVD	Actividades básicas de la vida diaria.
AIVD	Actividades instrumentales de la vida diaria.
ARWMC	del inglés <i>Age related White matter changes</i> .
ASAH2	Ceramidasa neutral.
CADASIL	Arteriopatía cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía de herencia autosómica dominante.
CSO	Centro semioval.
DCL	Deterioro cognitivo leve.
DCVa	Deterioro cognitivo de tipo vascular.
DRS-2	del inglés <i>Dementia Rating Scale-2<sup>nd</sup> version</i> .
DTI	del inglés <i>diffusion tensor imaging</i> .
DVa	Demencia vascular.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
EPVC	Enfermedad de pequeño vaso cerebral.
EPVD	Espacios perivasculares dilatados.
FLAIR	del inglés <i>Fluid attenuation inversion recovery</i> .
FRV	Factores de riesgo vascular.
GB	Ganglios de la base.
GRE	del inglés <i>Gradient recalled echo</i> .
GWAS	del inglés <i>Genome wide association study</i> .
HTA	Hipertensión arterial.
ICAM	del inglés <i>Intercellular adhesion molecule</i> .
ICS	Infartos cerebrales silentes.
IL	Infarto lacunar.
INE	Instituto Nacional de Estadística.
ISSYS	del inglés <i>Investigating Silent Strokes in hYpertensives, a magnetic resonance imaging Study</i> .
LSB	Lesiones de la sustancia blanca.
LSB-PV	Lesiones de la sustancia blanca periventriculares.
LSB-SC	Lesiones de la sustancia blanca subcorticales.



MAPA	Monitorización ambulatoria de la presión arterial.
MET	Receptor del factor de crecimiento del hepatocito.
MMP	Metaloproteinasa.
MMP9	Metaloproteinasa-9.
MSC	Microsangrados cerebrales.
PAD	Presión arterial diastólica.
PAS	Presión arterial sistólica.
REGICOR	Registre Gironí del Cor.
RMV	Resonancia magnética cerebral.
STRIVE	del inglés <i>STandards for Reporting Vascular changes on nEuroimaging</i> .
VCAM	del inglés <i>vascular cell adhesion molecule</i> .



# **INTRODUCCIÓN**



## 1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de pequeño vaso se refiere a todos aquellos procesos patológicos que dañan los vasos de pequeño calibre de diferentes órganos del cuerpo (por ejemplo, el cerebro, la retina o el riñón). La presente tesis está focalizada en la enfermedad de pequeño vaso cerebral (EPVC)<sup>1</sup>.

Por EPVC normalmente nos referimos a los cambios radiológicos y patológicos que se manifiestan en el parénquima cerebral como consecuencia del daño producido en las arterias, arteriolas y vénulas del cerebro. Los vasos de pequeño calibre no pueden visualizarse directamente con técnicas de imagen convencional, por lo que los identificamos con marcadores radiológicos indirectos. Actualmente, los marcadores más habituales de la EPVC son los infartos lacunares, las lesiones de la sustancia blanca (LSB), los microsangrados cerebrales (MSC), los espacios perivasculares dilatados (EPVD) y la atrofia cerebral<sup>2</sup>. Todos ellos pueden ser detectados mediante pruebas de resonancia magnética cerebral (RMC) y su presencia suele estar relacionada con la EPVC.

La EPVC forma parte del conjunto de enfermedades cerebrovasculares. Por enfermedad cerebrovascular nos referimos a la interrupción de la llegada de sangre a una o varias regiones del cerebro, hecho que a nivel clínico se puede traducir en diferentes alteraciones neurológicas focales (pérdida del habla, alteraciones de la marcha, etc.) de inicio agudo que se manifiestan en forma de ictus. Esta interrupción podrá ser producida principalmente por la oclusión —ictus isquémico, 85% de los casos— o la ruptura —ictus hemorrágico, 15% de los casos— de un vaso cerebral de mayor o menor calibre<sup>3</sup>.

En España el ictus tiene una incidencia de 141 casos por cada 100.000 habitantes/año, de los cuales un tercio implicará la muerte del paciente y otro tercio la discapacidad permanente<sup>4</sup>. En población mayor de 60 años esta incidencia es considerablemente mayor —hasta 475 episodios por cada 100.000 habitantes—<sup>5</sup>. La EPVC se considera causa posible del 20-25% de los ictus isquémicos y de la mayoría de hemorragias intracerebrales primarias<sup>6</sup>. No obstante, la prevalencia de la EPVC se estima mucho mayor, ya que puede evolucionar durante años como una enfermedad silente o subclínica. Por ejemplo, en España se estima que el 10% de los sujetos hipertensos de entre 55 y 75 años presenta infartos cerebrales silentes (ICS) que no han presentado sintomatología clínica evidente previa<sup>7</sup>. Estudios epidemiológicos internacionales sugieren una incidencia anual de ICS del 2-4%. Esta prevalencia sería mayor si consideramos otros marcadores de la EPVC como las LSB, dónde se ha descrito que hasta el 90% de la población mayor de 60 años presenta alguna lesión de este tipo en algún grado<sup>8</sup>.

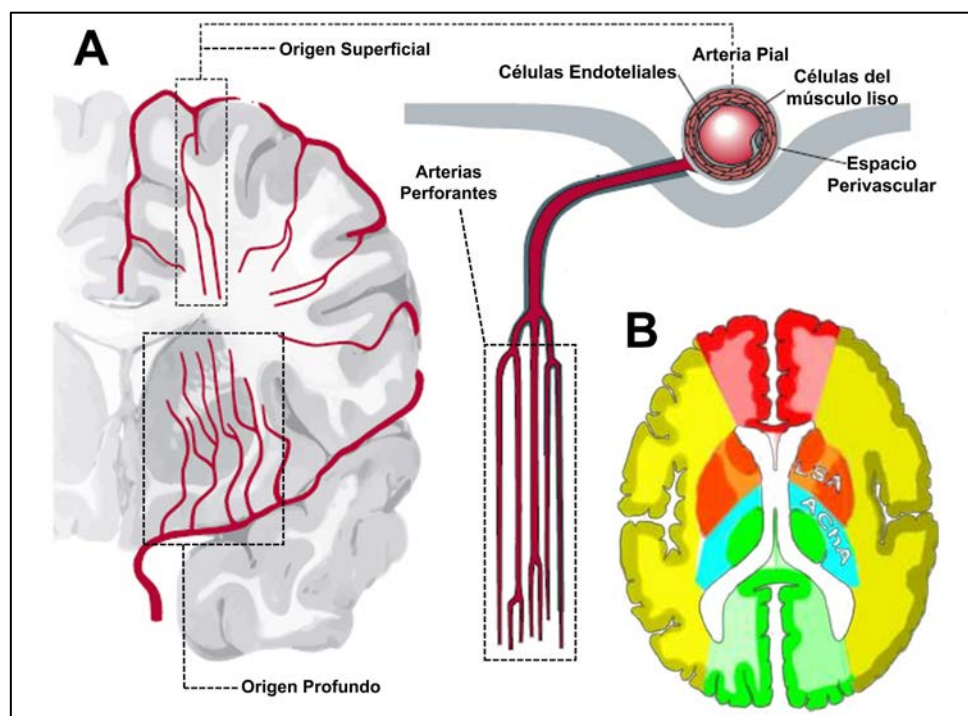
Así pues, la EPVC es una enfermedad altamente prevalente y su evolución está marcada por la acumulación encubierta de lesiones en el tejido cerebral. Como ya se ha comentado, una de las principales consecuencias es un aumento del riesgo de ictus, aunque también se considera la causa de hasta el 45% de los casos de demencia<sup>9</sup>, además de duplicar el riesgo de caídas y mortalidad<sup>10</sup>. Es difícil calcular el impacto real de la EPVC debido a su presentación subclínica y variada. No obstante, conocemos el impacto social y sanitario de sus consecuencias principales —el ictus y la demencia—. Ambas enfermedades están consideradas como las causas más frecuentes de mortalidad en España después de la cardiopatía isquémica<sup>4,11</sup>. Del mismo modo, ambas son dos de las enfermedades neurológicas que más gastos —directos e indirectos— ocasionan al sistema de salud. Concretamente, 27.711€ y 29.389€ por paciente/año para los casos incidentes de ictus y de demencia, respectivamente<sup>12,13</sup>.

Actualmente, a pesar de que conocemos la presentación radiológica de la EPVC y algunas de sus consecuencias, no están claros cuáles son los factores de riesgo y mecanismos fisiopatológicos que están implicados en su progresión. Tampoco está claro si la acumulación más rápida de lesiones tiene correlación con peores evoluciones clínicas. Uno de los principales obstáculos para resolver estas cuestiones ha sido la falta de estudios longitudinales que evalúen los cambios o progresión de la EPVC, así como la presencia de factores de riesgo de manera detallada<sup>14</sup>. A esto debe añadirse que ningún estudio epidemiológico ha definido la progresión de la EPVC en la población española.

Debido al gran número de procesos patológicos en los que está involucrada la EPVC es indispensable despejar todas estas dudas. Conociendo qué variables clínicas se asocian con la evolución de la EPVC, así como qué factores predicen peores pronósticos, podremos conocer mejor esta enfermedad e implementar mejores acciones preventivas.

## 1.2. ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIONES

La EPVC es el resultado del daño en las arterias perforantes del cerebro, aunque recientemente también se ha visto que este daño se extiende a las arteriolas, vénulas y capilares<sup>15</sup>. No obstante, cabe destacar que actualmente existe poco consenso en la definición de pequeño vaso. Este punto se ha contrastado mediante una encuesta administrada a diferentes centros que realizaban procedimientos neuropatológicos, y que demostró que no existía acuerdo en su definición en el 50% de los casos<sup>16</sup>.



**Figura 1. Arterias Perforantes:** En **A** puede observarse los dos orígenes principales de las arterias perforantes del cerebro, así como la anatomía básica de un vaso sanguíneo. En **B** se muestran por colores los principales territorios vasculares de los ganglios de la base. El caudado, putamen y la región anterior de la cápsula interna están irrigados por las arterias lenticuloestriadas (naranja). La parte posterior de la cápsula interna se irriga por las ramificaciones de la arteria coroidea anterior (azul). Finalmente, el tálamo se irriga por las arterias perforantes provenientes de la arteria cerebral posterior (verde). En amarillo y rojo se muestran los territorios que dependen de la arteria cerebral media y anterior, respectivamente. *Imagen modificada de Wardlaw et al. (2019) y Radiology assistant (<https://radiologyassistant.nl/neuroradiology/brain-ischemia-vascular-territories>).*

En términos generales, las arterias perforantes suelen considerarse aquellos vasos con un diámetro de 100 a 500  $\mu\text{m}$ . Éstos se originan de las arterias principales —arteria cerebral anterior, media, posterior y basilar—. Principalmente irrigan estructuras profundas, no corticales, de la línea media del cerebro y del tronco encefálico<sup>3,17</sup>. De manera más específica, suele considerarse que las arterias perforantes tienen dos orígenes: uno profundo que surge de los segmentos más proximales de las arterias principales en la base del cerebro (por ejemplo las arterias lenticuloestriadas que surgen de la arteria cerebral media, Figura 1-A); y otro más superficial que nace de segmentos más distales que irrigan la superficie del cerebro (Figura 1-A)<sup>1</sup>. Estos sistemas convergen después de atravesar los núcleos de sustancia gris subcortical y el córtex cerebral, respectivamente, y tienden a unirse en las áreas más profundas de la sustancia blanca. Otras características de estos vasos son la ausencia de anastomosis terminales ni de circulación colateral.

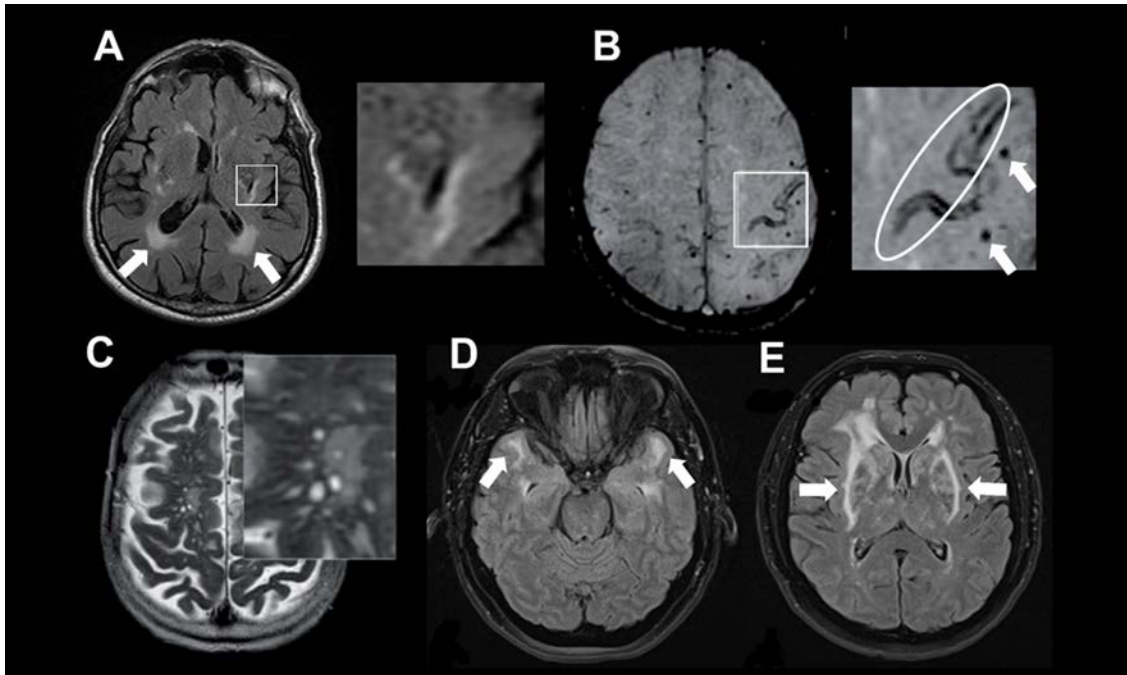
En función de las causas o mecanismos que produzcan el daño a estos pequeños vasos podremos clasificar la EPVC del siguiente modo:

#### **1.2.1. Tipo I: Arterioesclerosis**

Es el tipo más frecuente de EPVC y sus principales causas son la edad y la exposición a la hipertensión arterial (HTA), así como a otros factores de riesgo vascular (FRV). Este tipo de EPVC va a ser la tratada en la presente tesis doctoral, y por consiguiente se explicará en más detalle en los subsiguientes apartados.

Los vasos de pequeño calibre del cerebro son especialmente susceptibles a la HTA, que es el factor de riesgo principal de este tipo de EPVC. Esta susceptibilidad puede ser debida a que las arterias perforantes de la base del cerebro tienen un corto recorrido, lo que las hace más vulnerables al estrés mecánico producido por la HTA<sup>18</sup>. Debido a esto se producen una serie de cambios morfológicos en los vasos de pequeño tamaño, conocidos con el nombre de arterioesclerosis. Estos incluyen la reducción del número de células del músculo liso de la túnica media, la formación de depósitos de material fibrohialino, el estrechamiento de la luz del vaso y el engrosamiento de la túnica externa (lipohialinosis)<sup>19</sup>.

Cabe destacar que las presentaciones radiológicas de este tipo de EPVC serán muy variables. Principalmente varían en el número y tipo de lesiones en el parénquima (Figura 2-A). Esta presentación vendrá muy determinada por el tiempo durante el que haya evolucionado la enfermedad. De esta manera, a medida que progrese la enfermedad se observará un mayor volumen y espectro de lesiones en la RMC.



**Figura 2. Ejemplos de diferentes tipos de enfermedad de pequeño vaso cerebral:** **A)** Secuencia de RMC ponderada en FLAIR de paciente con EPVC de tipo arterioesclerótico (Tipo I). Pueden observarse LSB periventriculares como focos difusos de señal hiperintensa (indicadas con flechas). También aparece un infarto lacunar en los ganglios de la base, que se muestra en el detalle. **B)** RMC ponderada en secuencia de susceptibilidad magnética de paciente con angiopatía amiloide cerebral (Tipo II). Pueden observarse lesiones de forma redonda con señal hipointensa que corresponden a MSC de tipo lobar, magnificados en el detalle (flechas). También puede observarse siderosis superficial cortical en la zona de la circunferencia (imagen tomada de Charidimou et al., 2017). **C)** RMC ponderada en T2 de un paciente con angiopatía amiloide cerebral en la que pueden observarse espacios perivasculares dilatados en la región del centro semioval, como lesiones hiperintensas redondeadas o lineares (imagen tomada de Charidimou et al., 2017). **D)** RMC ponderada en FLAIR de un paciente con enfermedad de CADASIL (Tipo III) en la que se pueden observar LSB en los polos temporales. **E)** RMC del mismo paciente que en D), en la que pueden observarse LSB en la región de las cápsulas externas.

**Siglas:** LSB, Lesiones de la sustancia blanca; MSC, microsangrados cerebrales; RMC, Resonancia Magnética Cerebral;

### 1.2.2. Tipo II: Angiopátia amiloide cerebral esporádica y hereditaria

La Angiopátia amiloide cerebral se caracteriza por la acumulación del péptido amiloide A $\beta$ 40 en las paredes de las arterias y arteriolas de pequeño-medio calibre, preferentemente localizadas en el espacio leptomeningeo, el córtex y en menor medida los capilares y vénulas. A medida que la enfermedad se vuelve más grave y aumentan los depósitos A $\beta$ , se produce una reducción del número de células del músculo liso, la formación de microaneurismas y de necrosis fibrinoide que conllevan un aumento del riesgo de ruptura del vaso, con su consecuente sangrado<sup>20</sup>.

En estudios neuropatológicos previos se ha observado que la angiopatía amiloide cerebral es altamente prevalente en población de edad avanzada, observando algún grado de esta patología en el 55-59% de los sujetos con demencia y en el 28-38% de los pacientes sin demencia<sup>21</sup>. También se considera que es una de las principales causas de la hemorragia intracerebral lobar, la cual tiene una tasa de mortalidad alrededor del 50%<sup>22</sup>. También se ha asociado con un riesgo



aumentado de demencia, aunque es difícil estimar su impacto real debido a su aparición concomitante con la enfermedad de Alzheimer (EA) u otros tipos de EPVC —especialmente de tipo arterioesclerótico—<sup>23</sup>.

Radiológicamente, los marcadores de pequeño vaso más frecuentes de la angiopatía amiloide cerebral son los MSC lobares (Figura 2-B), los EPVD en la región del centro semioval (CSO, Figura 2-C) y las LSB, las cuales suelen presentar un predominio más posterior. También la siderosis cortical superficial.

### **1.2.3. Tipo III: Causas genéticas no amiloideas**

La causa monogénica más estudiada de este tipo de EPVC es la arteriopatía cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía de herencia autosómica dominante (CADASIL). El CADASIL es causado por mutaciones en el gen NOTCH3, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 y codifica el receptor NOTCH3 —principalmente expresado en células vasculares del músculo liso y pericitos—<sup>24</sup>. Su prevalencia se estima en unos 2-5 casos por cada 100.000 habitantes<sup>25</sup>.

Una de las consecuencias más destacables de esta enfermedad es la presencia de deterioro cognitivo, normalmente de predominio fronto-subcortical<sup>26</sup>. Otra de las manifestaciones más habituales es la migraña, estando presente en el 55-75% de los casos y con comienzo a la edad de 30 años<sup>27</sup>. También existe un mayor riesgo de ictus, frecuentemente de tipo isquémico y subcortical, con edad de presentación media a los 45-50 años<sup>28</sup>. Otras consecuencias son la presencia de encefalopatía (10% de los pacientes), los trastornos psicoafectivos (20-40% de los casos) y una esperanza de vida más reducida (65 años en hombres y 70 en mujeres)<sup>24</sup>.

A nivel radiológico los pacientes presentan IL y LSB a edades muy precoces. En cuanto a las LSB, es frecuente observarlas en las regiones de la cápsula externa (Figura 2-D) y en los polos temporales (Figura 2-E).

En este tipo de EPVC también se incluyen otras causas genéticas como el CARASIL —variante recesiva del CADASIL—, la enfermedad de Fabry, entre otras.

### **1.2.4. Otros tipos de EPVC**

En este grupo incluiríamos la EPVC producida por causas inmunológicas o inflamatorias (Tipo IV), la colagenosis venosa (Tipo V) y la producida por otras causas (Tipo VI, como la angiopatía post radiación).

### 1.3. MARCADORES RADIOLÓGICOS DE LA EPVC

A día de hoy el diagnóstico y estudio de la EPVC se realiza principalmente por medio de técnicas de neuroimagen (tomografía axial computarizada, RMC estructural e imagen por tensor de difusión [DTI])<sup>2</sup>. Esto es debido al hecho de que no se pueden estudiar “in vivo” los pequeños vasos del cerebro —por ejemplo, mediante el uso de técnicas neurosonológicas—.

La mayor parte de las investigaciones estudian la EPVC cuantificando sus lesiones por medio de RMC estructural. Por esta razón, en el año 2013 un grupo de diferentes centros de investigación desarrolló un consenso para unificar la terminología y las características radiológicas de los marcadores de la EPVC —*Standards for Reporting Vascular changes on nEuroimaging (STRIVE)*<sup>29</sup>—. Esto ha permitido generar consenso entre diferentes estudios, facilitando la comparación de resultados. Los resultados de la presente tesis doctoral están adaptados a estos criterios y definiciones.

A continuación se definen los marcadores principales de la EPVC según los criterios STRIVE.

#### 1.3.1. INFARTOS LACUNARES

Representando un 20-25% de los ictus isquémicos, los infartos lacunares (IL) o infartos subcorticales recientes se definen como una evidencia radiológica de un infarto reciente en el territorio de las arterias perforantes (normalmente ganglios de la base [GB], CSO o tronco encefálico), acompañado de una presentación clínica concordante con la imagen. Neuroradiológicamente, se caracterizan por ser lesiones hiperintensas en imagen ponderada por difusión; en la secuencia de recuperación de la inversión atenuada de fluido (del inglés: FLAIR); en secuencia ponderada en T2, e hipointensa en secuencia ponderada en T1. Generalmente se presentan como lesiones no mayores de 20mm<sup>29</sup>. A nivel clínico, la presentación más habitual es el síndrome motor puro, caracterizado por una hemiparesia que compromete con igual intensidad la cara, el brazo y la pierna, sin afectación sensitiva o compromiso de las funciones corticales. Otras manifestaciones pueden ser el síndrome sensitivo-motor, el síndrome sensitivo puro, la hemiparesia atáxica y la disartria-mano torpe<sup>3,30</sup>. Cabe destacar que hasta en el 30% de los casos estas manifestaciones clínicas no están acompañadas de infartos subcorticales recientes observables en la RMC<sup>31</sup>. A largo plazo, los IL pueden dar lugar a una “cavidad lacunar”, pero en muchos casos también pueden ser observados como lesiones hiperintensas o incluso desaparecer<sup>32</sup>. La proporción de IL que se acaban cavitando se estima que podría ser entre el 25-90% de los casos<sup>33,34</sup>.

En cambio, generalmente nos referiremos a aquellos IL crónicos que se han acabado cavitando como lagunas de supuesto origen vascular (Figura 3-A). Radiológicamente se suelen definir como lesiones redondas u ovoides hipointensas de entre 3 y 15 mm en secuencia FLAIR, con un anillo hiperintenso alrededor de la cavitación. La presencia de este anillo hiperintenso, que aparece debido a la gliosis, se usa frecuentemente para su diagnóstico diferencial con los EPVD. No obstante, cabe destacar que existen lagunas que no muestran un anillo de gliosis y EPVD que sí muestran dicho anillo, por lo que la diferencia principal con los EPVD se establecerá en base al diámetro máximo de 3 mm entre unos y otros

Clínicamente, muchos de estos IL habrán pasado desapercibidos. Se estima que la prevalencia de IL asintomáticos en la población general mayor de 50 años estaría entre el 5 y el 10%<sup>7,35</sup>. No obstante, algunos pacientes con IL silentes reportan manifestaciones clínicas atribuibles a un ictus cuando se les realiza una anamnesis, aunque no fueron reportadas en un centro de salud. En un estudio en población hipertensa se observó que un 7% de los pacientes que presentan ICS mostraron también sintomatología clínica compatible con un ictus<sup>36</sup>. Para esta tesis se ha empleado el término IL silente para referirnos a los IL crónicos sin sintomatología clínica que se han acabado cavitando, aunque la terminología de consenso es lagunas de supuesto origen vascular.

### 1.3.2. LESIONES DE LA SUSTANCIA BLANCA

Histológica e históricamente, estas lesiones fueron denominadas leucoaraiosis<sup>37</sup>. Actualmente se utiliza el término LSB o hiperintensidades de la sustancia blanca de supuesto origen vascular (Figura 3-B y C). Éstas se definen como lesiones focales o difusas hiperintensas en RMC ponderada en T2 o FLAIR. El término “de supuesto origen vascular” se utiliza para diferenciarlas de las LSB secundarias a otras causas (por ejemplo, las de esclerosis múltiple). Las LSB se suelen clasificar en función de la región que ocupan: subcortical (LSB-SC) y periventricular (LSB-PV)<sup>38</sup>. No obstante, también pueden aparecer en otras regiones como el puente, el tronco encefálico y el cerebelo. Su presentación suele ser simétrica en ambos hemisferios.

Patológicamente, las LSB extensas normalmente se corresponden con áreas de desmielinización y pérdida axonal como consecuencia de la exposición continuada a los FRV<sup>39, 40</sup>. En cambio, los pequeños focos hiperintensos o las LSB más sutiles representan en algunos casos activación endotelial, microglial o áreas de edema. Sin embargo, no existe un corpus extenso de estudios patológicos que hayan correlacionado los hallazgos histológicos con las LSB observadas por medio de la RMC<sup>41</sup>.

Las LSB son altamente prevalentes en la población de edad avanzada. En términos generales, la proporción de sujetos que muestran algún grado de LSB en la población general está entre el 39-96%. Este amplio rango es debido principalmente a las diferencias entre estudios en las características de la RMC y al modo de evaluación de las LSB<sup>39</sup>.

Otro de los focos de interés ha sido comparar las LSB de diferentes regiones anatómicas. De este modo, se considera que las LSB de diferentes regiones podrían tener fisiopatologías y consecuencias diferentes, aunque actualmente solo existen hipótesis.

En cuanto a la evaluación de las LSB, distinguiremos dos tipos principales de medición: la evaluación cualitativa y la cuantitativa. En cuanto a la evaluación cualitativa, la escala más utilizada es la escala de Fazekas<sup>38</sup>. Esta escala, que es ampliamente usada en la práctica clínica, evalúa cualitativamente el volumen de LSB en las regiones periventriculares y subcorticales — en la sección de métodos se ofrece una explicación más detallada—. Otra escala cualitativa es la “*Age Related White Matter Changes*” (ARWMC) que considera como LSB aquellos focos hiperintensos con un diámetro mínimo de 5 mm en distintas regiones del cerebro<sup>42</sup>. Por otro lado, en el ámbito de la investigación se ha popularizado la evaluación cuantitativa por medio de la segmentación del volumen de LSB. Esta segmentación se puede realizar de manera manual o semi-automática con programas informáticos gratuitos como MRICro e ITK-snap, entre otros. También es frecuente el uso de algoritmos plenamente automatizados construidos por medio de programas de pago como FreeSurfer (FreeSurfer ©, 2013, United States) y SPM (Statistical Parametric Mapping ©, 1991, United Kingdom). No obstante, también existen programas gratuitos como FSL (The FMRIB Software Library, United Kingdom), con rendimientos similares y que incluyen funciones muy útiles. Además, FSL puede utilizarse en el entorno de programación R por medio de la librería fslr.

### 1.3.3. MICROSANGRADOS CEREBRALES

Los MSC (Figura 5-A) son pequeñas hemorragias crónicas producidas por defectos estructurales en los vasos. Estas lesiones son visualizadas como pequeñas áreas de forma redonda — normalmente de 2-5 mm de diámetro, aunque pueden alcanzar los 10 mm— con señal hipointensa en secuencia ponderada en T2\* (*T2\*-gradient recalled echo* o GRE) o en secuencia de susceptibilidad magnética. Estas áreas hipointensas suelen representar depósitos de productos de la degradación de la sangre —principalmente hemosiderina—, que debido a sus propiedades paramagnéticas pueden ser detectadas en las secuencias de RMC citadas. En otro tipo de secuencias como ponderación en T1, T2 o FLAIR es poco probable observar los MSC<sup>29</sup>.

Un aspecto relevante de la evaluación de los MSC es que su localización está relacionada con la etiología del sangrado<sup>43</sup>. En términos generales, los MSC en regiones lobares (o en la unión cortico-subcortical) suelen estar relacionados con la angiopatía amiloide cerebral, mientras que aquellos que se encuentran en las regiones profundas de los GB se consideran que son debidos a la vasculopatía hipertensiva<sup>44-46</sup>.

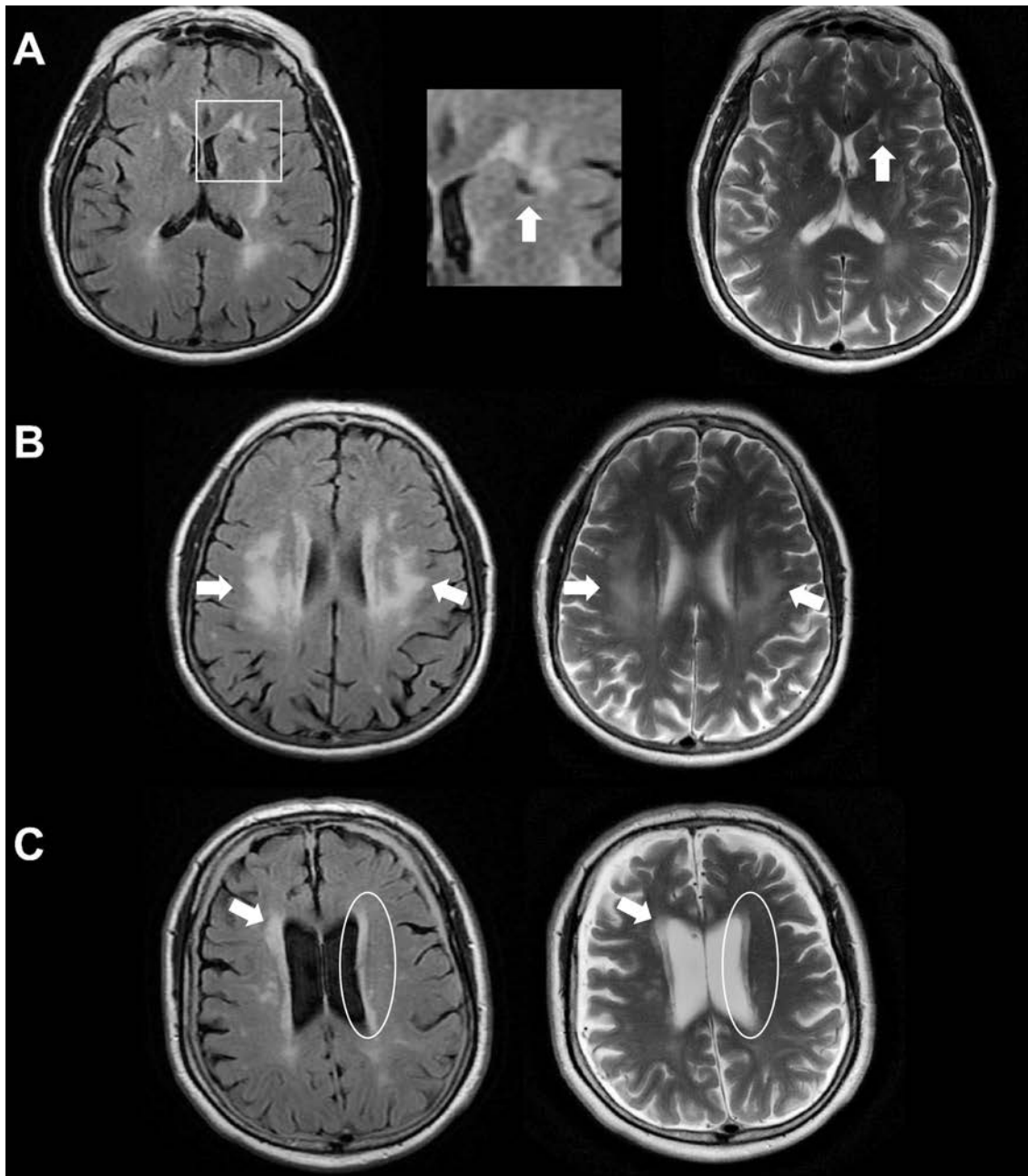
En cuanto a su epidemiología, se ha calculado que entre el 5-24% de la población de edad avanzada muestra MSC<sup>45, 47, 48</sup>. Este amplio margen de prevalencia es debido a la variabilidad entre estudios en las características de la RMC, sobretudo el tipo de secuencia, y en algunas variables demográficas como la edad, principal factor de riesgo de los MSC.

### 1.3.4. ATROFIA CEREBRAL

Definimos la atrofia cerebral en el contexto de la EPVC como una pérdida del volumen cerebral no causada por daños focales traumáticos o vasculares (p.ej., infartos)<sup>29</sup>. La pérdida de tejido se observa a nivel cortical como un aumento del tamaño de los surcos, y a nivel subcortical como un aumento del tamaño de los ventrículos y una reducción de los núcleos grises subcorticales.

La atrofia cerebral es un fenómeno heterogéneo que se presenta en muchas patologías neurológicas y no siempre es indicativo de pérdida neuronal<sup>49, 50</sup>. Muchos estudios de neuroimagen han relacionado la EPVC con la atrofia cerebral, principalmente de tipo subcortical (GB y sustancia blanca), aunque también se ha visto asociada con la atrofia cortical, mesencefálica, hipocampal y cortical focal en zonas que han quedado desconectadas debido a un infarto cerebral<sup>51, 52</sup>. El fenómeno en el que regiones corticales se atrofian debido al daño de la sustancia blanca es conocido como degeneración Walleriana.

Del mismo modo que con las LSB, existen diversas escalas cualitativas que permiten la evaluación del grado de atrofia en distintas regiones cerebrales. La más conocida es la escala de Scheltens, que evalúa el grado de pérdida de volumen cerebral en el córtex temporal medial<sup>53</sup>. También existen escalas para evaluar el grado de atrofia temporal anterior (escala de Davies) y de atrofia posterior (escala de Koedam), entre otras regiones<sup>54, 55</sup>. Además, podemos encontrar métodos de segmentación manuales, semiautomáticos y automáticos<sup>50</sup>.



**Figura 3. Marcadores radiológicos de la enfermedad de pequeño vaso cerebral:** Imágenes de RMC mostrando las lesiones principales de la EPVC. En la columna de la izquierda y de la derecha pueden verse RMC ponderadas en secuencia FLAIR y T2, respectivamente. **A) Infarto lacunar** que puede observarse como una lesión cavitada hipointensa con un halo hiperintenso a su alrededor en secuencia FLAIR. En el detalle podemos ver que la localización de este infarto sería en la cápsula interna, limitando con el caudado. En secuencia ponderada en T2 puede observarse como una lesión hiperintensa. **B) LSB subcorticales** que aparecen como focos difusos hiperintensos en FLAIR y en T2. En este ejemplo estas lesiones estarían confluyendo con las LSB de la región periventricular. **C) LSB periventriculares.** La flecha apunta a un foco de lesiones que se extienden a la región subcortical. Del mismo modo, las LSB periventriculares pueden aparecer en todo el perímetro de los ventrículos (marcado con una elipse).

**Siglas:** EPVC; enfermedad de pequeño vaso cerebral; LSB, lesiones de la sustancia blanca; RMC, resonancia magnética cerebral.

### 1.3.5. ESPACIOS PERIVASCULARES DILATADOS

Los EPVD son cavidades llenas de líquido cefalorraquídeo que rodean las arterias perforantes del cerebro en su curso desde el espacio subaracnoideo hasta el parénquima<sup>56</sup>. Los espacios perivasculares normalmente son estructuras microscópicas, pero cuando se dilatan debido al envejecimiento o algunas patologías pueden ser vistos en RMC<sup>57</sup>. Radiológicamente muestran intensidades similares a las del líquido cefalorraquídeo y normalmente son evaluados en secuencia ponderada en T2, aunque también pueden ser visualizados en secuencia ponderada en T1<sup>29, 58</sup>. Su diámetro habitual es inferior a los 3 mm, aunque pueden alcanzar los 10-20 mm<sup>59</sup>. Como ya se ha comentado, su principal diagnóstico diferencial será con los infartos lacunares, aunque otras lesiones como los quistes neurogliales también pueden complicar su evaluación. Las estructuras neuroanatómicas donde se suelen evaluar estas lesiones son la región del CSO (Figura 5-B), y de los GB (cápsula interna, tálamo, putamen, caudado e ínsula, Figura 5-C). En ambas regiones los EPVD suelen presentarse como lesiones con forma redonda o lineal. Otra región en la que se sabe que aparecen los EPVD es el hipocampo<sup>60, 61</sup>, aunque existe menos literatura al respecto. Debido a esta escasez de bibliografía, la evaluación de los EPVD del hipocampo será uno de los objetivos de esta tesis.

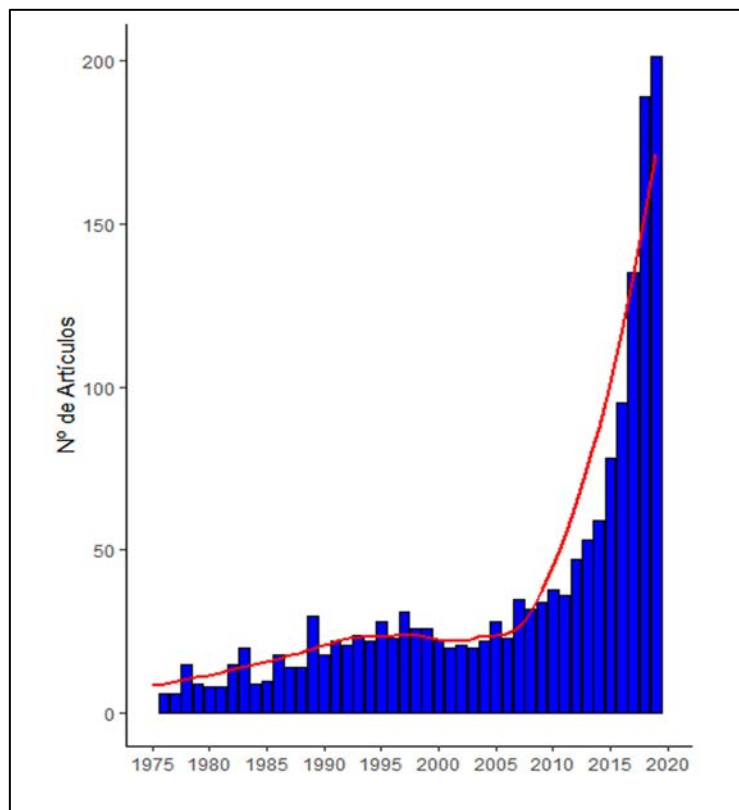
El espacio perivascular forma parte de la unidad neurovascular y del sistema linfático, siendo una de las principales vías de deshecho de metabolitos, como por ejemplo el péptido A $\beta$ <sup>62</sup>. Es por esta razón que una de las hipótesis que se ha planteado es que la aparición de este marcador sea debida a un fallo en el funcionamiento de este sistema.

Aunque a día de hoy no existen conclusiones sólidas sobre su importancia clínica<sup>63, 64</sup>, se ha visto que los EPVD están relacionados con otras lesiones de la EPVC<sup>65</sup>, o con varios de sus factores de riesgo como la HTA o la rigidez arterial<sup>66</sup>. De hecho, se considera que el predominio de EPVD en la región del CSO podría ser indicativo de la angiopatía amiloide cerebral o de EA<sup>67, 68</sup>, mientras que en los GB podrían estar más relacionados con la EPVC debida a la HTA u otros FRV<sup>66</sup>. De hecho, esto ha llevado a que diferentes sistemas de evaluación global de la EPVC incluyan los EPVD de los GB como un marcador más a considerar<sup>69</sup>. Actualmente se considera que estas lesiones podrían representar un signo precoz de la EPVC y de otras patologías, por lo que su estudio se ha popularizado en los últimos 5-10 años (figura 4).

Los estudios actuales muestran que los EPVD en grado extenso podrían mostrar una alta prevalencia en población de edad avanzada, observando porcentajes del 20-50% en función del estudio, del tipo de población evaluada y de las regiones anatómicas estudiadas<sup>60, 64, 65</sup>. También se considera que esta variabilidad se debe a diferencias en la resolución de la neuroimagen entre

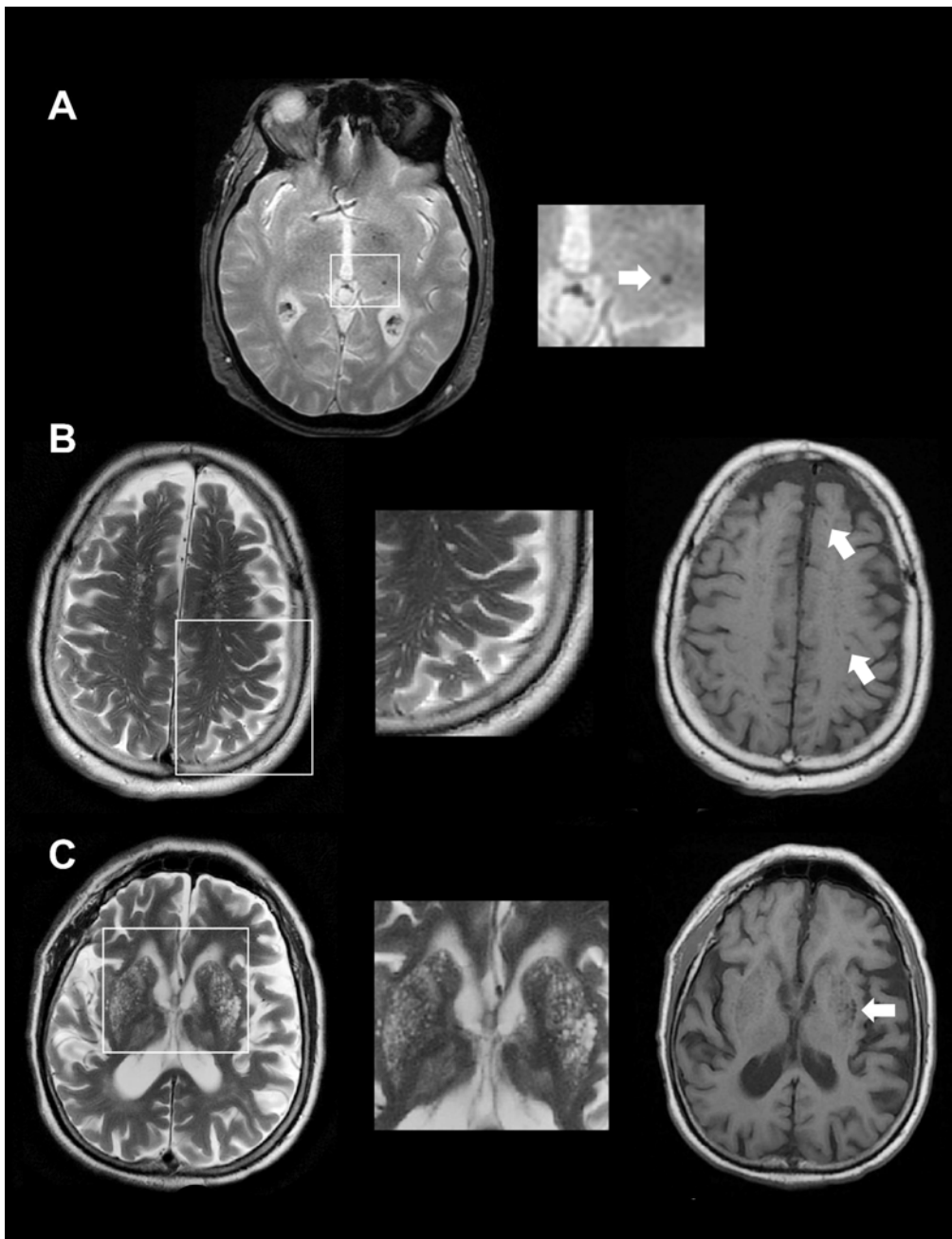
los diferentes estudios, hecho que puede condicionar en gran medida la visibilidad de estas lesiones.

También existe una gran heterogeneidad en su evaluación. Actualmente las escalas más utilizadas son la escala de Potter y la escala de Rotterdam<sup>58, 70</sup>. Aunque estas escalas serán explicadas en la sección de métodos con más detalle, ambas representan un conteo de los EPVD. Otro foco de investigación muy reciente ha sido la evaluación automatizada de estos marcadores de RMC, aunque este método avanza lentamente debido a sus características radiológicas y a su diagnóstico diferencial con otras lesiones. No obstante, actualmente existen dos grupos principales que han propuesto algoritmos para la evaluación de los EPVD, ambos mediante estrategias de aprendizaje automático. Un estudio se ha realizado mediante el algoritmo supervisado “*support vector machine*” y otro mediante “*neural-networks*”<sup>71, 72</sup>.



**Figura 4. Tendencia de estudio de los espacios perivasculares dilatados:** Los datos han sido extraídos de “Pubmed.gov” realizando la siguiente búsqueda: “virchow robin spaces OR enlarged perivascular spaces OR dilated perivascular spaces OR large perivascular spaces”. La construcción del gráfico se ha realizado con el software R.





**Figura 5. Marcadores radiológicos de la EPVC:** RMC de diferentes pacientes con lesiones de la EPVC. La imagen A se trataría de una RMC ponderada en secuencia GRE, mientras que B y C se tratarían de RMCs ponderadas en secuencia T2 (izquierda) y T1 (derecha). **A) Microsangrado cerebral profundo** que aparece en el tálamo. En secuencia GRE estas lesiones pueden verse como focos redondos hipointensos. **B) Paciente con un grado extenso de EPVD en la región del centro semioval.** En T2 se observan como lesiones con forma redondas o lineales hiperintensas de menos de 3 mm de diámetro. En T1 se observan preferentemente aquellos espacios perivasculares más dilatados (marcados con una fecha). **C) Paciente con un grado extenso de EPVD en la región de los ganglios de la base.** Las características radiológicas serán parecidas a la de los EPVD del centro semioval. En los ganglios de la base estas lesiones acostumbran a tener forma redonda en el caudado, cápsula interna, putamen y tálamo; y forma lineal en la región de la ínsula. En T1 se han marcado aquellos espacios perivasculares más dilatados. La forma redonda, simetría y la falta de gliosis en secuencia FLAIR nos ayudarán a distinguirlos de los infartos lacunares, los cuales acostumbran a presentar una forma más irregular.

**Siglas:** EPVD, espacios perivasculares dilatados; RMC, resonancia magnética cerebral.

## 1.4. PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PEQUEÑO VASO CEREBRAL

Hasta este momento se han destacado dos de las características más importantes de la EPVC: el carácter encubierto de ésta a nivel clínico y su alta prevalencia. No obstante, la EPVC incluye una dimensión temporal en la que las lesiones que la integran se acumulan en el cerebro hasta el punto en que deja de ser subclínica. Así pues, la EPVC debe entenderse como una enfermedad dinámica que tiende a progresar<sup>14</sup>.

Cabe mencionar que el estudio de la progresión de la EPVC ha empezado a recibir atención principalmente en la última década, cuando los estudios poblacionales más grandes (Framingham, Rotterdam, AGES-Reyjavik, ARIC, SMART, 3C-Dijon)<sup>73-77</sup> empezaron a publicar datos de la incidencia de lesiones —principalmente de las LSB—. En estos estudios, además de reportar datos sobre los cambios de la EPVC, se destaca que los principales factores de riesgo de progresión de la EPVC conocidos hasta la fecha son la edad y la presencia de lesiones previas de pequeño vaso en una RMC —así como otros FRV que serán discutidos en secciones posteriores—.

A continuación describiremos la incidencia de los marcadores principales considerando los datos epidemiológicos previos. En la tabla 1 ofrecemos un resumen de esta información. Cabe destacar que hasta la fecha no existen datos de la progresión de la EPVC en población española y tampoco se han realizado estudios en población hipertensa sin ictus previo.

- *Lesiones de la sustancia blanca*

La progresión de las LSB normalmente se ha evaluado con el cálculo del cambio en el volumen por medio de los sistemas que se han descrito anteriormente —segmentación automatizada o semi-automatizada—. No obstante, también se han desarrollado escalas cualitativas, como por ejemplo la escala de progresión de Rotterdam, que será descrita en apartados posteriores<sup>78</sup>.

Hasta la fecha se ha demostrado que las LSB progresan con el tiempo mediante la confluencia de lesiones previas o como la aparición de nuevos focos de desmielinización. No obstante, existe una gran variabilidad de progresión entre estudios, observándose rangos desde 0.1 a 6.6 cm<sup>3</sup>/año<sup>79</sup> (tabla 1). Esta diversidad podría ser debida a la heterogeneidad de las características demográficas y de FRV de cada estudio poblacional, así como de la resonancia magnética o del protocolo de determinación del volumen (si ha sido ajustado o no por el volumen intracraneal, por ejemplo). El predictor más importante de progresión de las LSB es el volumen o existencia previa de lesiones. Por ejemplo, se ha reportado que los pacientes con un grado extenso de LSB basales (una puntuación de 2 o más según la escala de Fazekas) progresan de media unos 1.3-

## Introducción

1.5 cm<sup>3</sup>/año, mientras que los pacientes con un grado menor muestran progresiones incipientes, incluso en seguimientos de hasta 9 años<sup>80</sup>.

También es interesante destacar algunos estudios recientes que con técnicas de DTI han estudiado la progresión de las LSB. Con esta técnica se ha demostrado que la integridad de la sustancia blanca puede verse alterada en regiones de “sustancia blanca de apariencia normal”, localizadas en la penumbra de los focos de LSB observadas por medio de RMC estructural<sup>81</sup>. Así pues, se considera que la integridad estructural evaluada en DTI es un marcador más precoz que las LSB observadas por otras técnicas de neuroimagen. Algunos grupos han intentado generar consenso entre distintos modos de evaluar dicha integridad o han propuesto sus propios sistemas de evaluación<sup>82, 83</sup>.

Hasta hace poco solo se estudiaba la progresión de las LSB. Con la aparición de diversos artículos hace 2-3 años se ha empezado a estudiar la regresión de estas lesiones<sup>32, 84</sup>. De este modo, por ejemplo, se ha podido confirmar que en la población general de edad avanzada hasta un 9.4% muestra regresión de las LSB, correspondiendo a una disminución de 0.1 cm<sup>3</sup>/año. Actualmente no se sabe a qué es debida esta regresión y tan solo existen algunas hipótesis. Por ejemplo, se ha hablado de que las LSB incipientes podrían representar áreas de edema que con el tiempo podrían acabar desapareciendo. También se ha hablado de que la regresión podría ser debida a un mejor control de los FRV<sup>32</sup>. Otras hipótesis son que la reducción del volumen podría ser un artefacto radiológico, como por ejemplo un efecto de volumen parcial de la imagen, o bien se produce por un efecto de la regresión a la media<sup>85</sup>.

Independientemente del porqué, estos resultados apuntan que el curso de la EPVC no tiene por qué ser lineal, pudiéndose observar regresión o cursos más acelerados en función de la edad u otras variables<sup>32</sup>.

- *Infartos cerebrales silentes*

La incidencia de ICS varía mucho entre estudios, sobretodo en función de si han sido poblacionales o de pacientes hospitalizados. Podríamos describir un rango de incidencia anual aproximada entre el 0.4 y el 9.5%<sup>73, 79, 86, 87</sup>. Si nos centramos en los estudios en población general podemos definir un rango de incidencia anual entre el 1 y el 3.5% (tabla 1)<sup>73, 88-90</sup>. Como en el caso anterior, las LSB y los infartos lacunares previos—silentes o no— son los predictores más asociados con la incidencia de ICS<sup>91</sup>.

Hasta la fecha, dos estudios han publicado datos de infartos lacunares o lagunas que “desaparecen”. En la bibliografía actual no existen datos de regresión de ICS de otro tipo que no

sean lacunares. Concretamente, se han reportado tasas de regresión de lagunas del 0.4% y 2.9% en población general y con ictus previo, respectivamente<sup>32, 92</sup>. Cabe mencionar que en el caso de la desaparición de los infartos lacunares podría ser debida a que éstos no necesariamente se cavitan. Otra causa podría ser que la cavidad se reincorpore a los ventrículos, por ejemplo debido a la expansión de éstos por la atrofia.

- *Microsangrados cerebrales incidentes*

Los MSC han sido menos estudiados en comparación a los marcadores descritos previamente. No obstante, disponemos de datos de su incidencia anual en la población general, que estaría entorno el 2.2 y el 3.4%<sup>79, 93, 94</sup>.

Como en el caso anterior, diversos estudios han reportado datos de regresión de los MSC que se sitúan entre el 0.2 y 0.7% en la población general<sup>32, 93</sup>. En el caso de los MSC, su regresión es especialmente susceptible a ser provocada por un efecto de volumen parcial debido a su pequeño tamaño. Otra hipótesis es que la hemosiderina de los MSC es eliminada por los macrófagos<sup>95</sup>.

- *Espacios perivasculares dilatados*

Actualmente no hay publicados datos acerca de la progresión de los EPVD, y por eso mismo será uno de los objetivos abordados en esta tesis.

Tabla 1 Progresión de la enfermedad de pequeño vaso cerebral en los estudios poblacionales principales

Estudio	Población	Nº	Edad Media <sup>a</sup>	Progresión LSB <sup>b</sup>	Incidencia ICS <sup>c,d</sup>	Incidencia MSC <sup>c</sup>
Rotterdam	Población general	803-1352	68.3-71.0	0.2 cm <sup>3</sup> /año <sup>96</sup>	0.7-3.6% <sup>73, 89, 96</sup>	2.9-3% <sup>93, 96, 97</sup>
AGES-Reykjavik	Población general	1949	74.6	1.2 cm <sup>3</sup> /año <sup>75</sup>	0.8% <sup>75</sup>	3.4% <sup>75</sup>
ARIC	Población general	810-983	61.0	0.5 cm <sup>3</sup> /año <sup>77, 98</sup>	1.6% <sup>98</sup>	
3C-Dijon	Población general	1118	72.0	0.3 cm <sup>3</sup> /año <sup>76</sup>		
Framingham	Población general	1352	54.0	0.2 cm <sup>3</sup> /año <sup>99</sup>		
Cardiovascular Health Study	Población general	1433-1919	74.0	5.6% <sup>100</sup>	2.9% <sup>88</sup>	
RUN-DMC	Población general	276	62.5	0.5 cm <sup>3</sup> /año <sup>32</sup>	2.3% <sup>32</sup>	2.2% <sup>32</sup>
SMART-MR	Población con FRV	565	57.0	0.6 cm <sup>3</sup> /año <sup>74</sup>	2.2% <sup>74</sup>	
HYBRID	Población con HTA y/o ictus lacunar	128	58.6	11.1% (subcortical) <sup>101</sup> 7.35% (periventricular) <sup>101</sup>	2.7% <sup>101</sup>	2.8% <sup>101</sup>
LADIS	Población con LSB extensas	358-396	73-74	2.2 cm <sup>3</sup> /año <sup>102</sup>	5.8-6.1% <sup>86, 91</sup>	
CASISP	Pacientes con ictus previo	500-584	59.7	38.5% <sup>103</sup>		11.0% <sup>103</sup>
ADNI	Clinica de Memoria	819	74.5	6.6 cm <sup>3</sup> /año <sup>104</sup>		

Revisión sistemática de la progresión de los marcadores de la EPVC reportada por los estudios poblacionales principales.

a: En algunos estudios pueden existir rangos porque un mismo marcador se ha reportado en diferentes muestras de la misma cohorte.

b: La progresión de las LSB se ha reportado como el cambio en el volumen (cm<sup>3</sup>/año) o bien el porcentaje anual de pacientes mostrando progresión, en caso de haberse evaluado por medio de escalas cuantitativas. Cabe destacar que algunos estudios corrigen el volumen de LSB por el tamaño de la cavidad intracranial y otros estudios no.

c: La incidencia de los ICS y los MSC se muestra como porcentaje de casos nuevos al año.

d: Los ICS en la mayoría de estudios únicamente se han considerado los de tipo lacunar.

**Signos:** ICS, infartos cerebrales silentes; LSB, lesiones de la sustancia blanca; MSC, microsangrados cerebrales.

## 1.5. FACTORES DE RIESGO DE LA EPVC

### 1.5.1. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES

Los factores de riesgo modificables de la EPVC no son conocidos actualmente con tanta claridad como en las otras etiologías de la enfermedad cerebrovascular. La dificultad principal radica en que diferentes factores de riesgo pueden estar asociados con diferentes lesiones de la EPVC. También resulta más complicado porque la mayoría de datos provienen de estudios transversales y los factores de riesgo asociados a la carga de lesiones no tienen por qué ser los mismos que se asocian a la progresión de la EPVC. A continuación se presenta un resumen de los principales factores de riesgo modificables que se han descrito hasta la fecha.

#### 1.5.1.1. Hipertensión

La HTA es el FRV más importante y más prevalente de la EPVC, así como de la mayoría de enfermedades cerebrovasculares. En España se calcula que la HTA afecta a 2 de cada 5 personas mayores de 18 años, y 3 de cada 4 si consideramos la población mayor de 65 años<sup>105</sup>. Estos datos epidemiológicos se han descrito considerando como puntos de corte para el diagnóstico de HTA los 140/90 mm Hg habituales. No obstante, cabe considerar las definiciones de la HTA como un concepto cambiante. De hecho, en los últimos años hemos visto como ha habido un replanteamiento de estos puntos de corte. De este modo, las guías americanas de 2017 definían un estadio I de hipertensión como una presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) superior a 130/80 mm Hg<sup>106</sup>. No obstante las guías europeas de 2018 y NICE de 2019 mantenían la definición de estadio I de hipertensión en los habituales 140/90 mm Hg<sup>107</sup>. En la tabla 2 se comparan ambos tipos de definiciones de HTA.

En cuanto al efecto de la HTA en la EPVC, se ha calculado que los pacientes hipertensos tienen el doble de probabilidades de padecer ICS<sup>108</sup>. También se ha visto que los niveles de presión se asocian con el volumen y progresión de las LSB<sup>109</sup>, con los MSC profundos<sup>110</sup> y con los EPVD, especialmente en la región de los GB<sup>111</sup>.

No obstante, con el surgimiento de nuevas definiciones de HTA, algunos grupos han evaluado qué puntos de corte predicen mejor la presencia o progresión de la EPVC. Diversas investigaciones reportan asociaciones más significativas en el caso de los puntos de corte de 130/80<sup>112, 113</sup>. Sin embargo, todavía no hay conclusiones claras y existe una falta de estudios longitudinales que complica saber qué diana de presión arterial (PA) mitiga mejor la evolución de la EPVC. En este sentido, serán muy reveladores diversos ensayos clínicos que intentan

responder a esta cuestión y que actualmente están en curso<sup>114</sup>. También podemos destacar que los pocos estudios que han evaluado esta asociación de manera longitudinal se han focalizado únicamente en la progresión de las LSB, olvidando otros marcadores de la EPVC. Sería por tanto de interés evaluar el beneficio de estos objetivos de PA en la EPVC considerando la progresión de manera global, tal y como se realiza en algunos estudios transversales<sup>69</sup>, creando una puntuación que refleje el grado de progresión general de la EPVC.

Otro de los focos de investigación ha sido si la medida ambulatoria de la presión arterial (MAPA) permite mejorar la predicción de la EPVC. La MAPA permite tomar mediciones más fiables de la PA en comparación a las del consultorio, las cuales están sujetas a diferentes fuentes de error<sup>115</sup>. Diversos estudios, transversales en la mayoría de los casos, han demostrado que la MAPA muestra asociaciones más significativas con el volumen de lesiones en comparación a la presión del consultorio<sup>116, 117</sup>. Quedaría por tanto definir el beneficio de usar este tipo de monitorización en la predicción de las lesiones incidentes.

Otra de las líneas de investigación ha sido el estudio de otros componentes de la PA, como por ejemplo la variabilidad a corto plazo (24 horas) medida con la MAPA. Estudios transversales previos en población hipertensa confirman que esta variabilidad en las cifras de PA sería un predictor independiente de las lesiones de pequeño vaso<sup>118</sup>. No obstante, quedaría por saber si esta asociación se mantiene en estudios longitudinales. Además, la variabilidad también se puede estudiar visita a visita. De hecho, estudios recientes confirman una relación entre esta variabilidad a largo plazo y la progresión de las LSB<sup>119</sup>.

Con todo, a pesar de que sabemos que la HTA es el principal FRV de la EPVC, todavía quedan muchos interrogantes que resolver. Así pues, en esta tesis doctoral se abordarán diversas de las cuestiones que se han descrito.

**Tabla 2. Puntos de corte para el diagnóstico de hipertensión según las guías americanas y europeas.**

Diagnóstico	Guías Americanas		Guías Europeas		
	PAS mm Hg	PAD mm Hg	PAS mm Hg	PAD mm Hg	
Óptimo			<120	Y	<80
Normal	<120	Y	<80	120-129	O 80-84
Normal-Alto	120-129	Y	<80	130-139	O 85-89
Estadio 1	130-139	O	80-89	140-159	O 90-99
Estadio 2	≥140	O	≥90	160-179	O 100-109
Estadio 3			≥180	O	≥110

### 1.5.1.2. Enfermedad Renal Crónica

Afectando del 8 al 16% de la población general, los pacientes con enfermedad renal crónica padecen un mayor riesgo de sufrir ictus o demencia<sup>120, 121</sup>. El cerebro y los riñones comparten diferentes características, entre ellas el hecho de estar expuestos a un gran volumen de flujo sanguíneo, de ser muy vulnerables a los cambios de presión arterial, y de compartir FRV. De hecho, los riñones son considerados un órgano diana del daño producido por la HTA.

Así pues, no han sido pocos los estudios que han investigado la relación entre la enfermedad renal crónica y la EPVC. Esto se ha realizado observando la asociación de diferentes marcadores de función renal, especialmente la microalbuminuria y el filtrado glomerular estimado, con la carga de lesiones cerebrales. Los estudios transversales confirman esta asociación para todos los marcadores de la EPVC y la carga de lesiones global, encontrándose asociaciones más consistentes en el caso de la microalbuminuria<sup>122-124</sup>. En un estudio de metaanálisis, la presencia de albúmina en la orina se relacionaba con todas las lesiones de la EPVC<sup>125</sup>. Sin embargo, cabe mencionar que la presencia de microalbuminuria no debería considerarse únicamente como un marcador de función renal, sino también como un indicador de que existe daño endotelial.

En lo que se refiere a la enfermedad renal crónica en relación a la progresión de la EPVC, los estudios han sido menos habituales y con resultados conflictivos<sup>126, 127</sup>. Sería muy interesante conocer si la presencia de enfermedad renal crónica predice la evolución de la EPVC, o si sus cambios podrían utilizarse para monitorizar la progresión de lesiones a nivel cerebral en caso de que la afectación en ambos órganos discorra de forma paralela. Debido a la falta de estudios en este tema, este será uno de los objetivos evaluados en esta tesis doctoral.

### 1.5.1.3. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es otro de los FRV más prevalentes en España, afectando hasta al 10-16.3% de la población<sup>128</sup>. A pesar de la que la diabetes es uno de los principales FRV para el ictus, su relación con la EPVC no está tan clara. Por ejemplo, aunque sí se ha visto que la diabetes se asocia de manera consistente con el grado de atrofia cortical, su relación con el volumen de LSB no ha sido confirmada en todos los casos<sup>109, 129</sup>. En cuanto a los ICS, la asociación también sería más débil en comparación al ictus, exceptuando el caso de los pacientes con enfermedad renal crónica<sup>130</sup>. Así pues, actualmente no se sabe con seguridad si la diabetes es un FRV independiente de la EPVC, o por el contrario, las asociaciones que se observan son debidas a las comorbilidades de estos pacientes<sup>130</sup>.



#### **1.5.1.4. Dislipemia**

Como en el caso anterior, la relación entre las LSB y la dislipemia no ha sido confirmada en la mayoría de estudios<sup>109, 131</sup>. En el caso de los ICS, la asociación parece ir en la misma dirección que en el riesgo del ictus pero con un efecto más débil<sup>130</sup>. La relación entre el colesterol y los MSC tampoco estaría clara actualmente<sup>132, 133</sup>.

#### **1.5.1.5. Obesidad**

A pesar de que el aumento de índice de masa corporal y la obesidad abdominal son otros de los principales FRV del ictus, su relación con los ICS es más discutida debido al reducido número de estudios. En cuanto a la relación con las LSB, la mayoría de estudios no han mostrado asociación entre obesidad y LSB cerebral.<sup>134</sup>

#### **1.5.1.6. Tabaquismo**

Se ha estimado que el tabaquismo dobla el riesgo de ictus isquémico. Nuevamente, en el caso de los ICS esta relación no se confirma con la misma claridad<sup>130</sup>. En cuanto a las LSB, la mayoría de estudios han reportado resultados negativos<sup>109</sup>, aunque en estudios de DTI se ha visto que las personas no fumadoras presentan una mayor integridad microestructural en la sustancia blanca<sup>135</sup>. Análogamente, un estudio longitudinal observó mayores niveles de progresión de las LSB en los pacientes fumadores<sup>73</sup>.

#### **1.5.1.7. El síndrome metabólico**

El síndrome metabólico —definido como la presencia de por lo menos tres de los siguientes FRV: HTA, glucosa alta en sangre, niveles altos de colesterol total o LDL, o bajos de HDL y la obesidad abdominal— se ha visto asociado a los ICS en la mayoría de estudios<sup>136</sup>. En cuanto a las LSB, se ha visto que el síndrome metabólico se asocia con el volumen de las lesiones, aunque no aporta más información que considerar únicamente la HTA<sup>137</sup>.

#### **1.5.1.8. Estilo de vida**

La dieta y el ejercicio físico podrían ser dos componentes muy relevantes para reducir el impacto y progresión de la EPVC debido a su efecto positivo en la cifras de PA. Por ejemplo, la dieta mediterránea se asocia con un menor volumen de LSB<sup>138</sup>. Análogamente, se ha relacionado la actividad física con una mejor integridad de las fibras de sustancia blanca mediante estudios de DTI<sup>139</sup>.

### 1.5.2. FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES

La edad es el factor de riesgo no modificable más importante de la EPVC, incrementándose el riesgo especialmente a partir de los 60 años. De hecho, algunos estudios recientes han demostrado que la relación entre la edad y la progresión de la EPVC es exponencial<sup>32</sup>. También se ha descrito que en edades medias de la vida, algunos de los FRV que se han descrito podrían tener mayor importancia. Debido a que principalmente se estudian pacientes de edad avanzada, esta podría ser una de las razones que dificulte observar relaciones entre la EPVC y los FRV clásicos. De este modo algunos estudios confirman, por ejemplo, que el efecto de la PA elevada tendría un mayor efecto de los 40 a los 50 años de vida en relación al volumen de LSB<sup>99</sup>.

Posiblemente, el factor de riesgo no modificable más estudiado ha sido la predisposición genética, sobretodo en relación a las LSB. Más allá de las causas monogénicas de la EPVC, se ha visto que de un 55 a un 75% de la variabilidad radiológica de las LSB podría ser hereditaria<sup>140-142</sup>. También se han realizado estudios de asociación de variantes genéticas, observando que el gen de NOTCH3 también estaría involucrado en las formas esporádicas de la EPVC<sup>143</sup>. En cuanto a los estudios de GWAS (del inglés: *genome wide association study*), una investigación que tenía como objetivo primario el volumen de LSB llevada a cabo en 10.000 sujetos sin ictus previos reveló un locus de riesgo en el cromosoma 17q25<sup>144</sup>.

Finalmente, el sexo no se ha encontrado asociado con las lesiones de la EPVC esporádica de manera consistente<sup>79, 130</sup>.

## 1.6. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

Llegados a este punto podemos constatar que la HTA será el principal predictor de la EPVC tipo I, y posiblemente, de su progresión<sup>19</sup>. Además, el efecto de la HTA promoverá o modulará la mayoría de procesos subyacentes al desarrollo y progresión de la EPVC.

En este apartado comentaremos algunos de los principales mecanismos por los cuales la HTA puede dañar los pequeños vasos.

### 1.6.1. POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS

#### 1.6.1.1. Cambios adaptativos

La exposición sostenida a cifras elevadas de PA conlleva una serie de cambios morfológicos en la estructura de los vasos, que intentarán adaptarse para soportar el estrés mecánico producido por la HTA. Estos cambios en ocasiones se producen por un aumento de la anchura de la capa de células del músculo liso, que aumenta el grosor de la pared vascular y disminuye su luz —remodelamiento hipertrófico—<sup>145</sup>. En otras ocasiones los cambios se manifiestan como una reorganización de las células del músculo liso, la cual mantiene estable el grosor de la pared vascular, pero también provoca una disminución de la luz —remodelamiento eutrófico—. En ambos casos conlleva un aumento de la resistencia vascular. Ambos procesos se representan en la figura 5.

#### 1.6.1.2. Daño endotelial

La HTA, además de provocar estos cambios morfológicos, es la principal causa de la arterioesclerosis y de sus consecuencias, el daño endotelial.

El endotelio es la capa más interna del vaso, y es un órgano dinámico que sirve como barrera funcional y estructural entre la sangre y la pared del vaso. Las células endoteliales, que conforman la estructura de este órgano, son las responsables de mantener la homeostasis vascular junto con otras células circulantes y las células del músculo liso<sup>146</sup>. Entre sus funciones encontramos la regulación del tono vascular y de la fibrinólisis, además de la participación en la inflamación y la angiogénesis.

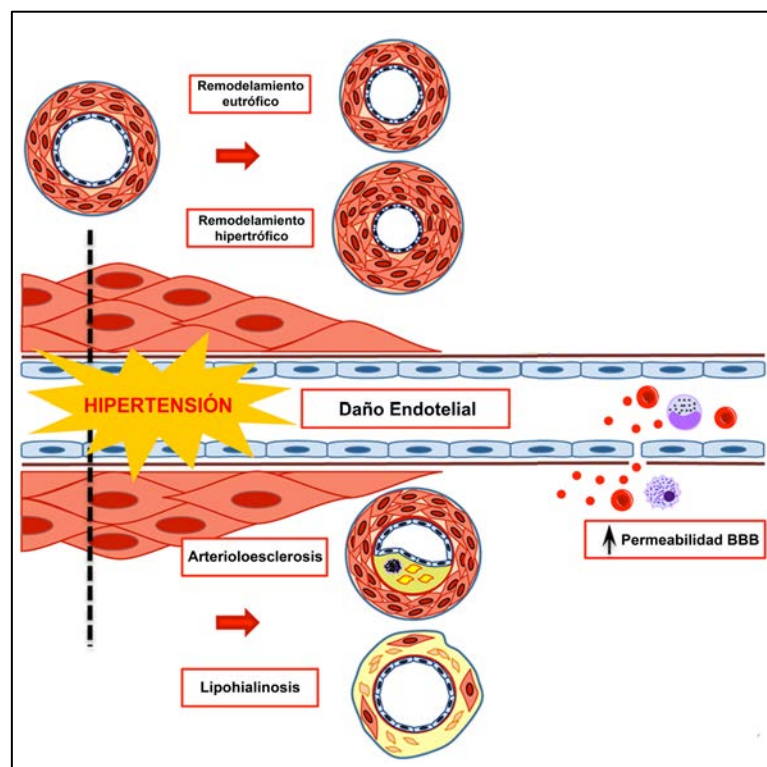
La HTA, la presencia de estímulos proinflamatorios y la generación de radicales libres conducirán al daño endotelial (Figura 6). Podemos definir a grandes rasgos el daño endotelial como la pérdida de la habilidad de los pequeños vasos para dilatarse y contraerse en función de la demanda de flujo sanguíneo por parte del cerebro, y el aumento de la permeabilidad del vaso.

Los marcadores de daño endotelial más estudiados en la EPVC son las moléculas de adhesión celular intercelular y vascular (ICAM y VCAM)<sup>147</sup>, las selectinas E y P y la homocisteína<sup>148</sup>. Otro de los marcadores más estudiados en relación con el daño endotelial es la microalbuminuria.

### 1.6.1.3. Ruptura de la Barrera Hematoencefálica

Las células endoteliales son parte de la unidad neurovascular e integrantes de la barrera hematoencefálica (BHE), donde muestran fenotipos específicos con uniones estrechas. La BHE controla el intercambio de solutos, moléculas y células circulantes entre el plasma y el líquido intersticial. El aumento de permeabilidad de la BHE debido al daño endotelial se ha relacionado tanto con la carga de lesiones de la EPVC, como con su progresión<sup>149, 150</sup>.

Un marcador plasmático de aumento de la permeabilidad de la BHE son las metaloproteinasas (MMP), que son proteínas secretadas por neuronas y células gliales. Las MMP han sido asociadas a diversos marcadores de la EPVC, especialmente en el caso de la MMP-9<sup>151, 152</sup>.



**Figura 6.** Representación gráfica de los principales mecanismos de acción por los cuales la hipertensión daña los vasos sanguíneos. Imagen modificada de Faraco et al (2013).

### **1.6.2. USO DE BIOMARCADORES**

El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la EPVC ha ido ligado al estudio de los biomarcadores. Se definen como una característica que puede ser medida de forma objetiva y que se relaciona con un proceso biológico subyacente, el cual puede ser normal o patológico.

El estudio de los biomarcadores ha permitido conocer mejor los procesos involucrados en la EPVC, aunque actualmente no han tenido aplicaciones directas en su diagnóstico. Como viene siendo una constante, actualmente la mayoría de resultados provienen de estudios transversales. Además, el marcador más estudiado han sido las LSB, y sobretodo se han analizado biomarcadores candidatos (o concretos) en sangre. Sería por tanto muy interesante saber si los biomarcadores que se han reportado en estudios transversales predicen o permiten monitorizar los cambios de la EPVC. Actualmente las principales proteínas y procesos involucrados con el volumen de las LSB han sido los relacionados con la disfunción endotelial<sup>147, 151</sup>, la inflamación<sup>153, 154</sup>, el metabolismo lipídico<sup>155</sup>, la hemostasis<sup>156</sup>, entre otros<sup>152</sup>.

Cabe destacar que la mayoría de estas investigaciones se tratan de estudios dirigidos a proteínas concretas. Hasta la fecha no se han realizado estudios proteómicos en pacientes con progresión de la EPVC esporádica. Este tipo de estudios podrían ser muy interesantes no solo por el descubrimiento de nuevas moléculas que puedan ayudar en el diagnóstico de la EPVC, sino porque pueden aportar información sobre los procesos o vías biológicas implicadas en la evolución de la EPVC<sup>152</sup>. Así pues, otro de los objetivos establecidos en la presente tesis doctoral será descubrir moléculas, vías y mecanismos implicados en la progresión de la EPVC por medio de técnicas proteómicas y estudios de validación.

## 1.7. PRONÓSTICO DE LA EPVC

Hasta ahora hemos descrito la EPVC como una enfermedad en la que sus lesiones tienden a acumularse con la edad y la exposición a determinados FRV. La clínica de la EPVC viene caracterizada por un largo período asintomático en la que puede pasar desapercibida. Esto, sumado al hecho que la EPVC produce lesiones cerebrales que son por si mismas muy frecuentes en el envejecimiento, han sido las principales causas que han complicado el estudio de la EPVC y que ha hecho que se infravaloren sus consecuencias. No obstante, aunque quedan muchos interrogantes por resolver que iremos exponiendo a lo largo de esta sección, hoy en día se estiman algunas de sus consecuencias principales.

### 1.7.1. AUMENTO DEL RIESGO DE EVENTOS CARDIOVASCULARES

La EPVC es la causa de hasta el 20-25% de los ictus isquémicos, siendo el infarto lacunar la principal manifestación clínica de la EPVC. También se ha estudiado si las lesiones cerebrovasculares de la EPVC se asocian con un mayor riesgo de ictus o de otros eventos de tipo cardiovascular. Sería muy interesante poder responder a esta cuestión, ya que determinadas lesiones de la EPVC podrían usarse en modelos de predicción del riesgo cardiovascular. De este modo, podrían implementarse estrategias de prevención más dirigidas.

Actualmente la mayoría de estudios han intentado relacionar la carga de lesiones con el riesgo de ictus, siendo las LSB y los ICS los marcadores más estudiados. En términos generales se ha visto que la presencia de LSB y ICS triplica y duplica el riesgo de ictus, respectivamente<sup>10, 157</sup>. Cabe destacar que en el caso de las LSB los resultados han sido muy diferentes en función del tipo de población estudiada, observándose incidencias de 7 a 20 veces superiores en poblaciones con FRV<sup>10</sup>. En cuanto al tipo de ictus, la mayoría de estudios han reportado que las LSB se asociarían preferentemente con el ictus isquémico, estando menos clara la relación con el ictus hemorrágico<sup>158, 159</sup>. En el caso de los ICS, los resultados descritos han llevado a algunos autores a plantearse hasta qué punto estas lesiones deben ser consideradas hallazgos incidentales, y si en los pacientes con ICS deben aplicarse estrategias de prevención secundaria<sup>160</sup>. Sin embargo, actualmente el tratamiento de estos pacientes sigue siendo un foco de incertidumbre.

En cuanto a los eventos cardiovasculares de otros tipos —infarto agudo de miocardio, anginas de pecho, insuficiencia cardíaca, etcétera—, la literatura es más escasa. Algunos autores han publicado riesgos incrementados de muerte por causa vascular o infarto agudo de miocardio en sujetos con LSB extensas, principalmente si éstas son de tipo periventricular<sup>161, 162</sup>. Sin embargo,

estas asociaciones no han sido replicadas en todos los casos<sup>159</sup>. Así pues, se requieren más estudios para confirmar esta relación.

Tampoco se han publicado estudios que consideren la carga global de la EPVC<sup>69</sup>. Sería interesante estudiar si el riesgo de padecer un evento cardiovascular aumenta a medida que se amplía el espectro de lesiones de la EPVC observadas en la RMC.

#### **1.7.1.1. Ecuaciones de riesgo cardiovascular**

Las ecuaciones de riesgo cardiovascular son estimaciones del riesgo o la probabilidad de padecer un evento cardiovascular en un tiempo determinado. La más conocida es la ecuación de Framingham, la cual fue adaptada a nuestra población con el Índice del Registre Gironí del Cor (REGICOR)<sup>163</sup>. La ecuación del REGICOR calcula el riesgo de sufrir un evento coronario a 10 años utilizando como fuentes de información la edad, el sexo, la PA, el colesterol, la diabetes y el tabaquismo.

No obstante, las guías clínicas actuales no solo recomiendan establecer el riesgo del paciente hipertenso en base a estos FRV. También se recomienda evaluar otros marcadores subclínicos del daño de órgano diana de la hipertensión<sup>164</sup>. Algunos ejemplos serían la albuminuria, el filtrado glomerular, la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la presencia de arteriopatía periférica, entre otros. La priorización de estos marcadores subclínicos debería realizarse en base a su valor predictivo, el coste-beneficio y su disponibilidad.

En relación a lo explicado en el apartado anterior, sería muy interesante saber si la inclusión de los marcadores de la EPVC en las ecuaciones de riesgo permite mejorar la discriminación de los pacientes con mayor riesgo de sufrir un evento cardiovascular. También sería interesante el valor predictivo de estas lesiones en comparación a otros marcadores de daño subclínico. Por esta razón, este va a ser otro de los objetivos evaluados en esta tesis.

### **1.7.2. AUMENTO DEL RIESGO DE DEMENCIA**

#### **1.7.2.1. Definición y Epidemiología de la Demencia**

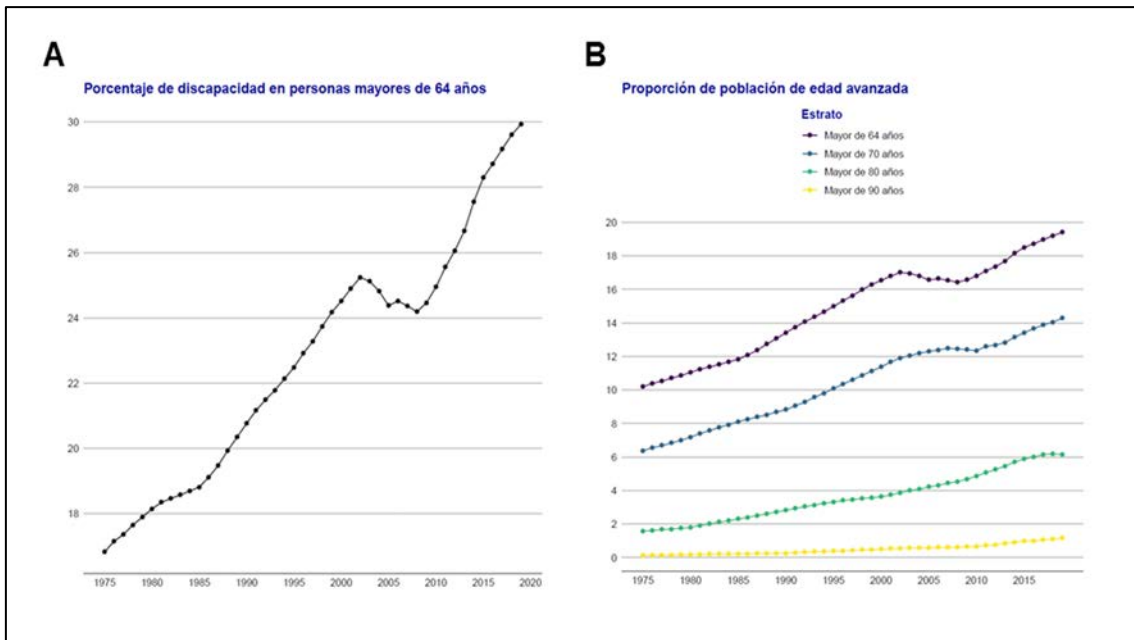
Según la OMS, la demencia es un síndrome de naturaleza progresiva que implica un deterioro de las funciones cognitivas superiores, es decir, de la memoria, la capacidad de juicio, el lenguaje, el cálculo, la orientación, entre otros procesos mentales. Estos déficits cognitivos, que suelen ir acompañados o precedidos de cambios en la personalidad o alteraciones psicoafectivas, conllevan una pérdida de la independencia del individuo<sup>165</sup>.

La prevalencia aproximada de la demencia en España se estima que es del 2% en la población de 65 a 69 años, y se duplicaría cada 5 años llegando a ser del 10-17% en población de 80 a 84 años<sup>13</sup>. La causa más frecuente de demencia es la EA. En España se calcula que la EA es la causa del 60-80% de los casos. En segundo lugar encontraríamos la demencia vascular (DVa), que si consideramos sus apariciones puras y mixtas —a menudo en combinación con la EA— abarcaría el 20-30% de los casos. En Europa se ha estimado que la prevalencia de EA y DVa en población mayor de 65 años sería del 4.4% y 1.6%, respectivamente<sup>166</sup>. En 2019 la OMS ha calculado que la demencia afecta a unos 50 millones de personas en todo el mundo, de las cuales el 60% viven en países de ingresos bajos o medios.

En 2008, el Instituto Nacional de Estadística (INE) calculó que 85 de cada 1000 habitantes sufre algún grado de discapacidad, siendo la demencia la quinta causa más frecuente de discapacidad en el adulto —por detrás de los problemas articulares, la depresión, las cataratas y la cardiopatía isquémica, a la cual puede ir asociada—. Estos datos de discapacidad aumentan anualmente (Figura 7-A) y conllevan importantes gastos sanitarios y no sanitarios al sistema público de salud. Concretamente se ha calculado que la demencia provoca entre 25.000-30.000€ de gasto anual por paciente —considerando costes directos e indirectos—, siendo la segunda enfermedad neurológica con más gasto sanitario<sup>167</sup>. Estas cifras alarmantes todavía se magnifican más si consideramos que el INE lleva años avisando del incremento de la proporción de población mayor de 65 años, tal como puede observarse en la Figura 7-B. De hecho, se estima que en 2050 uno de cada tres españoles tendrá más de 65 años.

Así pues, debido a la falta de tratamientos farmacológicos eficaces, es de necesidad urgente encontrar maneras de diagnosticar la demencia de manera precoz para intentar implementar estrategias preventivas. En este sentido se ha calculado que el diagnóstico precoz puede llegar a reducir la institucionalización en un 10%, y en un año su duración<sup>168</sup>.





**Figura 7. Tendencias Demográficas en la Población Española: A)** Porcentaje de personas mayores de 64 años con algún grado de discapacidad. **B)** Proporción de población de edad avanzada respecto al total de la población española. Des de 1975 se ha duplicado el número de personas de edad avanzada en todos los estratos de edad (mayores de 64, 70, 80 y de 90 años). Ambos gráficos se han realizado con datos abiertos del Instituto Nacional de Estadística (<https://www.ine.es/dynt3/inebase/es/index.htm?type=pcaxis&path=/t15/p419/a2017/p01/&file=pcaxis>). Los datos abiertos se han bajado a fecha de 2019. La construcción de los gráficos se ha realizado con el software R.

### 1.7.2.2. Deterioro Cognitivo de Tipo Vascular

El deterioro cognitivo de tipo vascular (DCVa) se podría definir como aquel declive de las capacidades mentales superiores, con o sin impacto en el nivel de independencia, el cual es o se sospecha que es secundario a la presencia de un ictus o de otras lesiones cerebrovasculares silentes (LSB, ICS, MSC, etcétera). Este tipo de deterioro cognitivo se observa hasta en la mitad de pacientes con infartos lacunares<sup>169</sup>. De manera similar también se ha visto que los pacientes con más carga de lesiones vasculares de pequeño vaso tienen una mayor probabilidad de presentar DCVa<sup>10, 170</sup>.

A día de hoy la definición de DCVa sigue siendo un tema de debate y las guías clínicas pueden mostrar diferentes definiciones en algunos aspectos concretos<sup>171, 172</sup>. En términos generales, los criterios generales clínicos serían<sup>171, 172</sup>:

- a) La existencia de un declive en la función cognitiva demostrada por medio de una exploración neuropsicológica.
- b) Presencia de enfermedad cerebrovascular, siendo la RMC el gold-standard para su detección.

El diagnóstico probable de DCVa se establecería respectivamente por:

a) La demostración causal entre la enfermedad cerebrovascular y el deterioro cognitivo. O bien una relación clara entre la gravedad, el patrón de los déficits y la presencia de lesiones cerebrovasculares difusas.

b) Ausencia de historia gradual o progresiva de los déficits que se pueda relacionar con la presencia de una enfermedad neurodegenerativa.

Cabe mencionar que en los últimos 10-15 años el concepto de DCVa ha mostrado una importante evolución. Inicialmente la definición de DCVa precisaba de la presencia de signos neurológicos focales debidos a un accidente cerebrovascular —por ejemplo, signo de Babinski, déficit sensitivo, presencia de hemiparesias, etcétera—<sup>173</sup>. Esto hacía que el DCVa se diagnosticara básicamente en aquellos pacientes que habían sufrido un ictus. Con el tiempo estas definiciones se han ido actualizando y se ha ampliado el espectro del DCVa. De este modo, hoy en día se reconocen formas más leves de DCVa, así como causas mixtas —en las que la causa vascular coexiste con otras patologías de base neurodegenerativa—. Tampoco se da tanta importancia al mecanismo específico de daño vascular o a la presencia de síntomas neurológicos focales.

En la siguiente sección se explicarán brevemente los diferentes tipos de DCVa que se consideran hoy en día.

### **1.7.2.3. Clasificación del Deterioro Cognitivo de tipo Vascular**

El DCVa se clasifica, en primer lugar, en función del grado de deterioro diferenciando el deterioro cognitivo leve (DCL) de tipo vascular, el cual será retomado en apartados posteriores, y el deterioro cognitivo de tipo vascular mayor o DVa. La diferencia básica entre estos dos diagnósticos será que el paciente con DCL de tipo vascular se caracteriza por preservar la independencia en las actividades de la vida diaria, mientras que el paciente con DVa presentaría una pérdida moderada o grave de su autonomía, la cual no es debida a las secuelas motoras o sensitivas que haya podido ocasionar el evento vascular<sup>172</sup>. A su vez, la DVa se puede clasificar en función de su etiología y presentación. En la Figura 8 se presenta un resumen de estas clasificaciones.

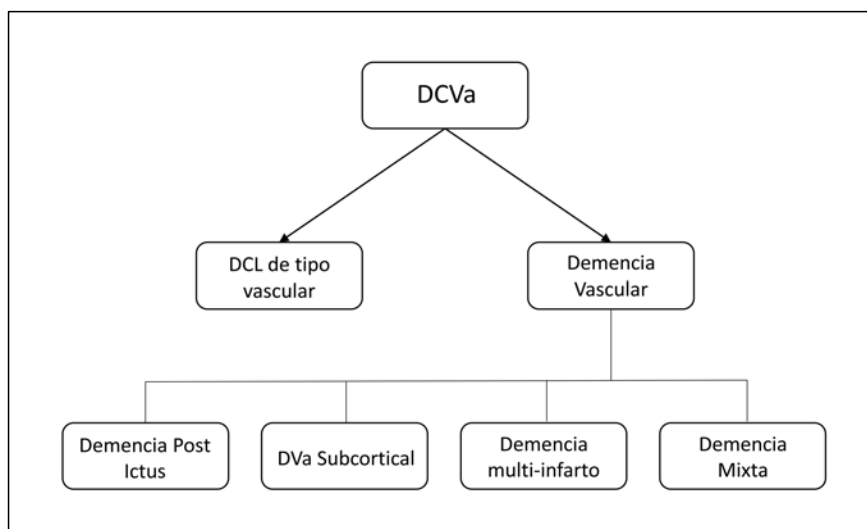
En primer lugar encontraríamos la demencia post-ictus. Podemos definir este tipo de DVa como la aparición de un deterioro cognitivo significativo en los 6 meses posteriores a un ictus. Los infartos pueden ser corticales, subcorticales o en regiones estratégicas, como el tálamo o el caudado. Se estima que el 20-30% de los pacientes que sobreviven a un ictus desarrollaran DVa

o DCVa, siendo el infarto lacunar el tipo de ictus que está más asociado con el DCVa<sup>174</sup>. También se ha visto que el riesgo de demencia post-ictus será mayor ante la presencia de menor escolarización, infarto recurrente, mayor grado de atrofia cortical y de mayor número de lesiones de la EPVC<sup>175, 176</sup>.

La demencia multi-infarto es un tipo de DVa que se caracteriza por la presencia en las pruebas de neuroimagen de múltiples infartos corticales<sup>172</sup>.

La demencia mixta incluye aquellos fenotipos que representan combinaciones de causas vasculares y neurodegenerativas, el efecto conjunto de las cuales conlleva un deterioro cognitivo en el paciente. Actualmente se recomienda especificar la causa neurodegenerativa a la que va asociada la patología vascular para un mejor manejo del paciente —es decir, DCVa-EA, DCVa-demencia por cuerpos de Lewy, etcétera—<sup>172</sup>. Estudios histopatológicos han demostrado que este tipo de demencia podría ser la causa más frecuente de deterioro cognitivo, encontrándose infra-diagnosticada<sup>177</sup>.

La EPVC es la causa más frecuente de demencia vascular subcortical. Los marcadores de RMC más habituales de este tipo de demencia son los IL y las LSB. En estudios longitudinales se ha podido ver, por ejemplo, que la progresión de las LSB, especialmente en la región periventricular, correlaciona con el declive en las funciones ejecutivas y velocidad de procesamiento de la información<sup>101, 178, 179</sup>. También se ha visto que la presencia basal de LSB se asocia con la conversión de DCL a demencia en seguimientos prospectivos<sup>170</sup>, a veces sin encontrar asociaciones<sup>180</sup>. El efecto de estas lesiones en la cognición se cree que podría ser debido a la desconexión de circuitos fronto-sucorticales que van desde el córtex prefrontal a los ganglios de la base, y de los tálamos a diferentes regiones corticales<sup>181</sup>.



**Figura 8.** Clasificación del Deterioro Cognitivo de Tipo Vascular. Siglas: DCL, Deterioro Cognitivo Leve; DCVa, Deterioro Cognitivo de Tipo Vascular.

#### 1.7.2.4. Deterioro Cognitivo Leve de causa vascular

El DCL se suele definir como un período de transición entre el envejecimiento normal y la demencia. Las primeras definiciones clínicas del DCL se realizaron en 1999 de la mano de Petersen et al.<sup>182</sup>, aunque anteriormente ya se habían realizado menciones similares al DCL usando otras terminologías. Petersen et al., a grandes rasgos, definieron el DCL como la presencia concomitante de quejas subjetivas cognitivas, de alteración objetiva de la memoria, y sin existir afectación de las actividades básicas de la vida diaria (ABVD), pudiendo existir leves alteraciones en el caso de las actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD). Estos criterios se redefinieron en 2004 por medio de grupos de profesionales que buscaron crear un consenso. De este modo, se consideró que no era necesario que la alteración neuropsicológica fuera en el dominio de memoria, pudiendo estar alterados uno o más dominios cognitivos —esto incluye funciones ejecutivas, velocidad de procesamiento de la información, atención, lenguaje, funciones visoespaciales, etcétera—<sup>183</sup>. Así pues, hoy en día el diagnóstico de DCL incluye un amplio espectro de presentaciones, incluyendo variedades amnésicas y no amnésicas. En líneas generales, los fenotipos principales del DCL se suelen clasificar en DCL amnésico y no amnésico, que a su vez podrán ser de dominio único o múltiple.

Actualmente se considera que el DCL es el principal factor de riesgo que predice la demencia incidente. Se estima que este diagnóstico lo padece del 10 al 20% de la población mayor de 65 años<sup>184, 185</sup>. En diferentes estudios se ha calculado la conversión anual de envejecimiento normal a DCL, observándose cifras entre el 2-7% en población de edad avanzada<sup>186, 187</sup>. Aun así, una revisión de la literatura muestra que se reportan cifras de incidencia tan altas como el 40%, lo cual es debido principalmente al tipo de población que se estudia —población general o clínicas de memoria— y a los criterios que han sido usados para diagnosticar el DCL<sup>186</sup>. Otro factor a tener en cuenta es la tasa de conversión de DCL a demencia. Ésta se estima entre el 5-20%<sup>184</sup>, la cual es muy superior a la que se suele reportar en población general —alrededor del 1-2%—. De nuevo, estas cifras podrán variar en función del tipo de población estudiada.

En la práctica clínica habitual, así como en diferentes estudios, también podemos observar pacientes que revierten de DCL a envejecimiento normal o que fluctúan entre los dos diagnósticos. Aunque no se han reportado tasas de regresión anuales, se estima que del 14 al 40% de los sujetos con DCL revertirá a envejecimiento normal<sup>188</sup>. Esta regresión puede ser debida a falsos positivos producidos por trastornos psicoafectivos u otras variables que puedan confundir el diagnóstico, pero también puede ser una fluctuación dentro del curso del paciente. De hecho, en el DCVa acostumbra a existir esta fluctuación.

Si las presentaciones amnésicas del DCL han sido más relacionadas con la EA, el DCL de tipo vascular normalmente presenta alteración de las funciones ejecutivas, pudiendo o no estar alterada la memoria<sup>189, 190</sup>. El diagnóstico de DCL de tipo vascular se suele fundamentar en la presencia de lesiones, a menudo subclínicas, en la RMC que se puedan relacionar con el deterioro observado. En varios estudios transversales se han reportado asociaciones significativas entre las lesiones de la EPVC y el riesgo de DCL<sup>65</sup>. No obstante, cabe destacar que la presencia de lesiones de la EPVC no confirma un diagnóstico de DCL de tipo vascular, ya que también puede existir una enfermedad neurodegenerativa de base. De hecho, se han encontrado asociaciones entre algunas lesiones de la EPVC y la EA u otras causas de demencia<sup>191</sup>.

Por otro lado, aunque actualmente sabemos que las lesiones de la EPVC predisponen a la demencia, no está tan claro si la progresión radiológica correlaciona con la evolución clínica en los estadios leves de la enfermedad como el DCL. Pocos estudios han evaluado si la progresión de las lesiones se asocia con el diagnóstico de DCL incidente<sup>192</sup>, y es por esta razón que este será otro de los objetivos que abordaremos en esta tesis doctoral. Conocer qué lesiones o qué ritmos de progresión tienen mayor probabilidad de predisponer al DCVa puede permitir implementar mejores estrategias preventivas y realizar un mejor manejo clínico de estos pacientes.

#### **1.7.2.5. Evaluación del DCVa**

En esta sección se resumirán las consideraciones básicas a la hora de evaluar el DCVa. En primer lugar se recomienda realizar una correcta anamnesis del paciente, preguntando sobre el inicio de los síntomas, el curso y el estado premórbido. Esto siempre será preferible realizarlo con el paciente y un segundo informador fiable.

En la exploración del paciente deberemos preguntar por las quejas subjetivas cognitivas, así como el grado de afectación de las ABVD y AIVD. También será recomendable explorar la presencia de síntomas psicoafectivos.

La exploración neuropsicológica será recomendable en la mayor parte de los casos y esta deberá ser lo suficientemente completa como para evaluar los dominios cognitivos principales: funciones ejecutivas, atención, lenguaje y memoria<sup>172</sup>. Siendo la duración recomendada de unos 60 minutos.

Las pruebas complementarias también incluirán algún tipo de prueba de neuroimagen, siendo la RMC el gold-standard.



## **OBJETIVOS**



## Objetivos de la tesis doctoral.

### 1. Descripción del problema:

- a. Determinar la progresión radiológica de la enfermedad de pequeño vaso cerebral en población hipertensa española.
- b. Observar si la progresión radiológica correlaciona con la evolución cognitiva y la aparición de deterioro cognitivo leve.

### 2. Identificación de factores de riesgo, mecanismos o marcadores que permitan monitorizar la evolución de la enfermedad:

- a. Comprobar si la medida ambulatoria de la presión arterial predice la progresión global de la enfermedad de pequeño vaso cerebral, y describir su beneficio respecto a las determinaciones del consultorio.
- b. Estudiar si el declive de la función renal —determinada por medio de diferentes biomarcadores— es paralelo a la incidencia de lesiones silentes.
- c. Analizar el proteoma de pacientes con progresión de las lesiones de la sustancia blanca con el objetivo de descubrir nuevas vías, proteínas y mecanismos implicados en la enfermedad de pequeño vaso cerebral.

### 3. Estudiar el pronóstico de los pacientes con lesiones cerebrovasculares silentes: determinar si existe asociación entre las lesiones de la enfermedad de pequeño vaso cerebral y el riesgo de evento cardiovascular.

### 4. Proponer nuevos marcadores radiológicos de la enfermedad de pequeño vaso cerebral: definir la prevalencia de los espacios perivasculares dilatados del hipocampo y observar si se asocian al resto de marcadores radiológicos de la enfermedad.







# MÉTODOS



La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo en la cohorte de pacientes del estudio ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives, a magnetic resonance imaging Study). En este apartado se ofrecerá una breve descripción del estudio ISSYS y de las visitas que lo integran. También se citaran las técnicas principales que se han usado para la valoración de las variables de interés. La descripción detallada de los métodos se encuentra en cada una de las publicaciones que componen los resultados.

### **3.1. ESTUDIO ISSYS**

#### **3.1.1. OBJETIVOS**

Los objetivos principales del estudio ISSYS son investigar la prevalencia de lesiones cerebrovasculares silentes en sujetos hipertensos de Barcelona, así como su impacto a nivel clínico y sus factores de riesgo asociados<sup>193</sup>.

#### **3.1.2. POBLACIÓN**

El estudio se llevó a cabo en pacientes con hipertensión esencial diagnosticada como mínimo un año antes de la inclusión en el estudio y con una edad entre 50 a 70 años. Los criterios de exclusión fueron:

- ✓ Historia de ictus o demencia.
- ✓ Contraindicación de la RMC.
- ✓ Sospecha de Síndrome de bata blanca.
- ✓ Enfermedad terminal.

El área sanitaria de referencia para este estudio corresponde a la zona Norte de Barcelona (SAP Muntanya) donde se contabilizan unos 27.000 pacientes hipertensos con edades comprendidas entre 50 y 70 años. El reclutamiento de los pacientes se realizó en 14 centros de atención primaria del área norte de Barcelona, dónde se facilitaba a los médicos de familia un listado con el muestreo aleatorio estratificado por sexo y edad. Así pues, los médicos de familia en base a la revisión de la historia clínica preseleccionaron los sujetos candidatos a participar en el estudio, a los que se invitó de forma telefónica. De este modo se consiguió reclutar una cohorte de 1.037 sujetos, de los cuales 976 se acabaron sometiendo a la RMC.

#### **3.1.3. DISEÑO**

El estudio ISSYS se trata de un estudio poblacional, observacional, prospectivo y longitudinal. La visita basal de inclusión se realizó entre el 2010 y el 2012 (N = 1.037). En esta primera visita los

## *Métodos*

pacientes se sometieron a una RMC, tests de cribado cognitivo, una exploración física, una recogida de datos clínicos (antecedentes, fármacos, etcétera), estudios de la PA y se tomaron muestras de sangre y orina.

Entre 2014 y 2016 se realizó una segunda visita presencial en pacientes que tenían un mayor riesgo de progresión de la EPVC. Este riesgo se definió como la presencia en la RMC basal de:

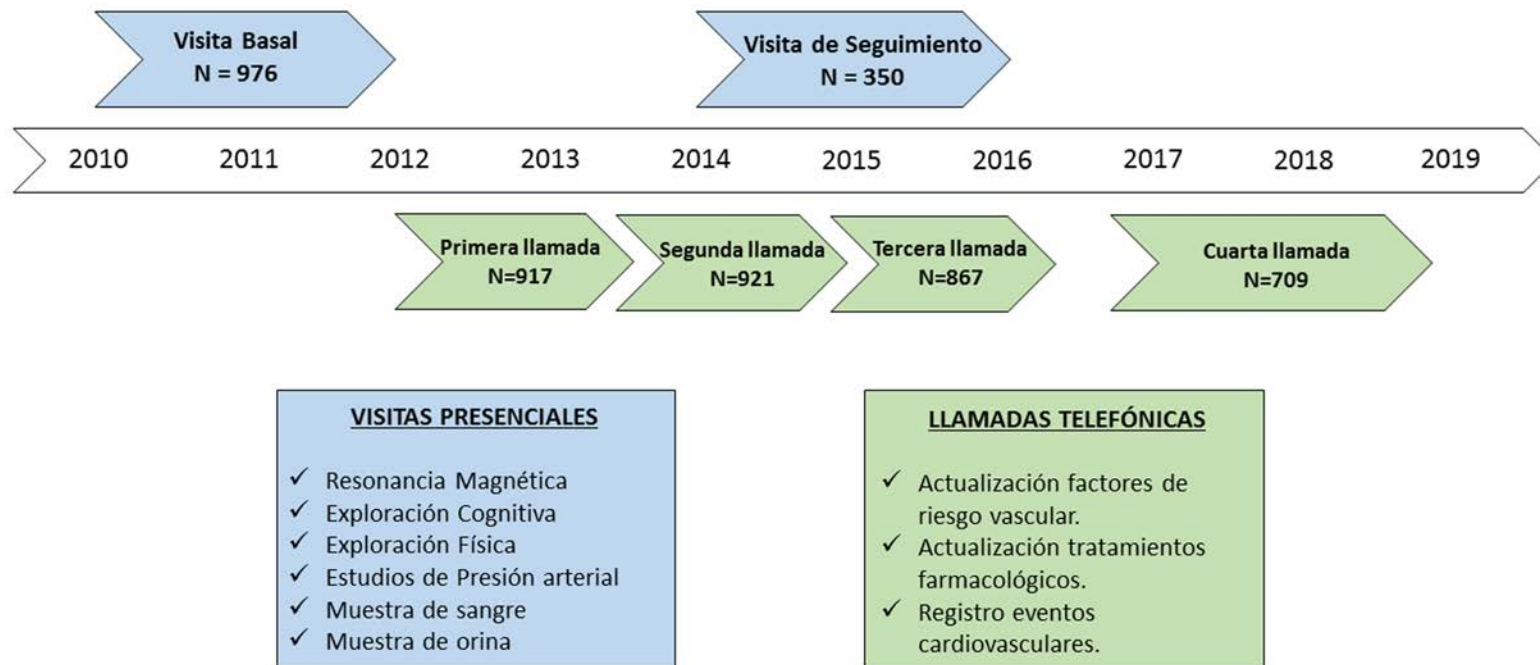
- ✓ Infartos cerebrales silentes.
- ✓ Lesiones de la sustancia blanca extensas.

De este modo se seleccionaron 483 sujetos para someterse a una segunda visita presencial con las mismas características y pruebas de la visita basal. De estos 483 individuos quisieron participar 361 (74.7%), de los cuales se sometieron a la RMC 350 pacientes. En esta muestra de pacientes se evaluó la progresión de la EPVC y es en la que se centra la mayor parte de los resultados de esta tesis doctoral.

Además, desde 2012 hasta 2019 se realizaron seguimientos telefónicos anuales a toda la cohorte de pacientes. El objetivo de estas llamadas era determinar los cambios en la los FRV, el tratamiento farmacológico y la aparición de eventos cardiovasculares.

En la figura 9 se muestra gráficamente el diseño del estudio ISSYS.

En los apartados subsiguientes explicaremos las principales pruebas realizadas en la visita presencial y en las llamadas telefónicas.



**Figura 9. Diseño del estudio ISSYS:** Las flechas azules y verdes representan visitas presenciales y no presenciales en la línea de tiempo, respectivamente.

### 3.1.3.1. Características de las Visitas Presenciales

Como se ha comentado, hasta la fecha se han realizado dos visitas presenciales en el estudio ISSYS —visitas basal (2010-2012) y de seguimiento (2014-2016)—. En ambas visitas se realizaron las siguientes pruebas:

- *Resonancia Magnética Cerebral:*

En las visitas basal y de seguimiento todos los pacientes se sometieron a una RMC en el mismo resonador de 1.5 Teslas (Signa HD×1.5; General Electrics, Waukeska, WI). Se obtuvieron secuencias axiales ponderadas en T1, T2, GRE y FLAIR y sagitales ponderadas en T1. Los cortes tenían un grosor de 5 mm con un gap de 1.5 mm —obteniéndose unos 20 cortes axiales y sagitales, aproximadamente—.

- *Exploración cognitiva:*

Todos los pacientes se sometieron a un test de cribado cognitivo tanto en la visita basal como de seguimiento, la *Dementia Rating Scale (DRS-2)*<sup>194</sup>. Este test se encuentra adaptado al castellano y se disponen de datos normativos en población española<sup>195</sup>.

La DRS-2 está compuesta por 5 grupos de tests que forman las escalas de atención, iniciación/perseveración, construcción, conceptualización y memoria. La puntuación total de la DRS-2 va de 0 a 144 puntos. Esta puntuación total se ajusta por edad y escolarización en base a los datos normativos en población española, obteniendo una puntuación escalar que va de 1 a 19<sup>195</sup>.

En ambas visitas a aquellos pacientes que presentaban una puntuación escalar  $\leq 8$ , la cual es sugestiva de deterioro cognitivo, se les invitaba a realizar una exploración cognitiva completa. En esta visita se les realizaba una exploración neuropsicológica completa, evaluando los dominios cognitivos principales, y una visita neurológica con el objetivo de determinar el estado cognitivo (envejecimiento cognitivo normal o DCL). También se evaluaba el estado anímico de los pacientes mediante un test de depresión y ansiedad, las ABVD y AIVD mediante un cuestionario estructurado y las quejas subjetivas de memoria<sup>196, 197</sup>.

En la tabla 3 se resumen las pruebas neuropsicológicas realizadas en el estudio ISSYS, así como las principales funciones evaluadas por éstas. El protocolo cognitivo completo del estudio también se encuentra publicado<sup>198</sup>.

Los criterios usados para el diagnóstico de DCL fueron adaptados a partir de los de Petersen-Winblad, de manera similar a como lo hicieron un grupo de investigación de la fundación ACE<sup>183, 199</sup>. De manera resumida, diagnosticamos DCL cuando se cumplían los siguientes supuestos:

- ✓ Una alteración objetiva en uno o más dominios cognitivos evaluados en la exploración neuropsicológica. La alteración se definió como una puntuación ajustada por debajo de 1 desviación estándar en comparación al grupo de referencia.
- ✓ Las ABVD deben estar preservadas, pudiéndose observar alteraciones leves en el caso de las AIVD.
- ✓ Presencia de quejas subjetivas de memoria reportadas por el paciente o por un familiar.
- ✓ Ausencia de enfermedad concomitante que pueda explicar el cuadro clínico.

Aquellos pacientes que estaban por encima del punto de corte en la DRS-2 o que se sometieron a la exploración cognitiva completa y no cumplieron con criterios de DCL fueron considerados como sujetos con envejecimiento normal.

El diagnóstico de DCL se determinó en ambas visitas y en función de las 4 transiciones posibles se categorizó a los sujetos como:

- ✓ Envejecimiento normal estable —envejecimiento normal en las dos visitas—.
- ✓ DCL estable —DCL en ambas visitas—.
- ✓ Reversión a envejecimiento normal —DCL en la visita basal y envejecimiento normal en la visita de seguimiento—.
- ✓ DCL incidente —envejecimiento normal en la visita basal y DCL en el seguimiento—.

**Tabla 3: Evaluación de la cognición en el estudio ISSYS**

<b>Prueba Psicométrica</b>	<b>Funciones evaluadas</b>
Dementia Rating Scale 2nd version	Global
<b>Exploración cognitiva completa*</b>	
Test de aprendizaje audioverbal de Rey	
Reproducción Visual 1 y 2 de la WMS	Memoria
Test de Stroop	
Trail Making Test parte A	
Trail Making Test parte B	
Fluencia Verbal fonética y semántica	Funciones ejecutivas
Imitación de posturas (Test Barcelona)	
Gesto Simbólico órdenes (Test Barcelona)	Praxias Ideomotoras
Test del Reloj	
Diseño de cubos de la WAIS III	Funciones visoconstructivas

\*La evaluación neuropsicológica completa se realizó en aquellos pacientes con sospecha de deterioro cognitivo según la puntuación ajustada por edad y educación de la DRS-2.

**Siglas:** WMS, *wechsler memory scale*; WAIS, *Wechsler Adult Intelligence Scale*.



## Métodos

- *Recogida de muestras:*

Se recogieron muestras de sangre en ambas visitas, de las cuales se obtuvo el plasma y el suero después de 15 minutos de centrifugación a 3.500 revoluciones por minuto. Posteriormente se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras se utilizaron para la determinación de la creatinina, usada para el cálculo del filtrado glomerular, y para el estudio de los biomarcadores.

También se recolectaron muestras de orina puntuales que se usaron para la determinación del cociente albúmina/creatinina.

- *Monitorización de la presión arterial:*

Los pacientes se sometieron a una monitorización de 24 horas de la PA mediante un dispositivo automatizado (Spacelabs Healthcare, Issaquah, Washington), validado previamente por la Sociedad Británica de la hipertensión<sup>200</sup>. Dicha monitorización se llevaba a cabo en días laborales y se animaba a los pacientes a mantener sus actividades habituales. Durante el día (06:00 a 22:59) se tomaban medidas cada 20 minutos y de noche (23:00 a 5:59) cada 30 minutos. De este registro se obtenían las medias de 24 horas, diurnas y nocturnas de PAS/PAD. El mal control del período de 24h, diurno y nocturno se definió en 125/75, 130/80, 110/65 de acuerdo con las guías clínicas americanas<sup>106</sup>.

### **3.1.3.2. Características de las llamadas telefónicas**

Anualmente se realizaba una llamada telefónica a toda la cohorte (N=1.037). En estas llamadas, en primer lugar, se actualizaban la aparición de FRV —control de la PA, incidencia de dislipemia, diabetes y fibrilación auricular— y la prescripción de fármacos. También se registraban la incidencia de eventos cardiovasculares. Los eventos cardiovasculares incidentes fueron definidos como nuevos infartos agudos de miocardio, accidente isquémico transitorio, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho, claudicación intermitente, arteriopatía periférica y muerte vascular. Se computaron los eventos cardiovasculares que requirieron una hospitalización de al menos 24 horas. Cuando se detectó un posible evento en alguna llamada, se revisaron las historias clínicas electrónicas para confirmarlo.

## **3.2. EVALUACIÓN DE LA EPVC**

### **3.2.1. Evaluación de la EPVC en la visita basal**

En la visita basal se evaluó la presencia de los diferentes marcadores de la EPVC en los 976 sujetos con RMC. Todas las lesiones se evaluaron según los criterios STRIVE<sup>29</sup>.

Los ICS se definieron como lesiones mayores de 3 mm en su diámetro más ancho, con una señal similar a la del líquido cefalorraquídeo en todas las secuencias y con un halo hipertenso alrededor en la secuencia FLAIR. Además, los ICS fueron considerados lacunares cuando su tamaño era como máximo de 15 mm y estaban localizados en los ganglios de la base, cápsula interna, tálamo, sustancia blanca profunda y tronco.

Los MSC se evaluaron a nivel lobar —unión cortico-subcortical y sustancia blanca subcortical—, profundo —sustancia gris de los ganglios de la base, cápsulas internas y externas, tálamo— e infratentorial —cerebelo y tronco encefálico— en la secuencia GRE<sup>201</sup>.

Las LSB de supuesto origen vascular se definieron como lesiones difusas hiperintensas en secuencia ponderada en T2 y FLAIR a nivel subcortical y periventricular. Para su cuantificación se utilizó la escala de Fazekas, que se trata de una valoración cualitativa de 0 a 3 en ambas regiones (periventricular y subcortical). Para esta tesis hemos considerado una puntuación  $\geq 2$  como extensa en ambas regiones, la cual a nivel periventricular implica presentar lesiones que se extienden hacia áreas profundas, y a nivel subcortical implica tener lesiones confluentes.

Los EPVD han sido definidos como estructuras lineares, ovales o redondas  $< 3$  mm y bien definidas con intensidad similar al líquido cefalorraquídeo en todas las secuencias. Los EPVD han sido evaluados en los ganglios de la base y en el centro semioval. En ambos casos se contaron los EPVD en aquella secuencia con una mejor visualización de las estructuras anatómicas y en el hemisferio que presentase un mayor número de EPVD, de acuerdo a los criterios de la escala de Potter<sup>58</sup>. Así pues ambos contajes se categorizaron en “0” (0 EPVD), “1” (1 a 10 EPVD), “2” (11 a 20 EPVD), “3” (20 a 40 EPVD) y “4” ( $> 40$  EPVD).

Para los EPVD del hipocampo se ha utilizado la escala de Adams et al<sup>70</sup>. Brevemente, se contaron los EPVD de ambos hipocampos (derecho e izquierdo). No obstante, cuando se llegaba a 20 EPVD se detenía el conteo, obteniendo una puntuación que podía ir de 0 a 20.

### **3.2.2. Progresión de la EPVC**

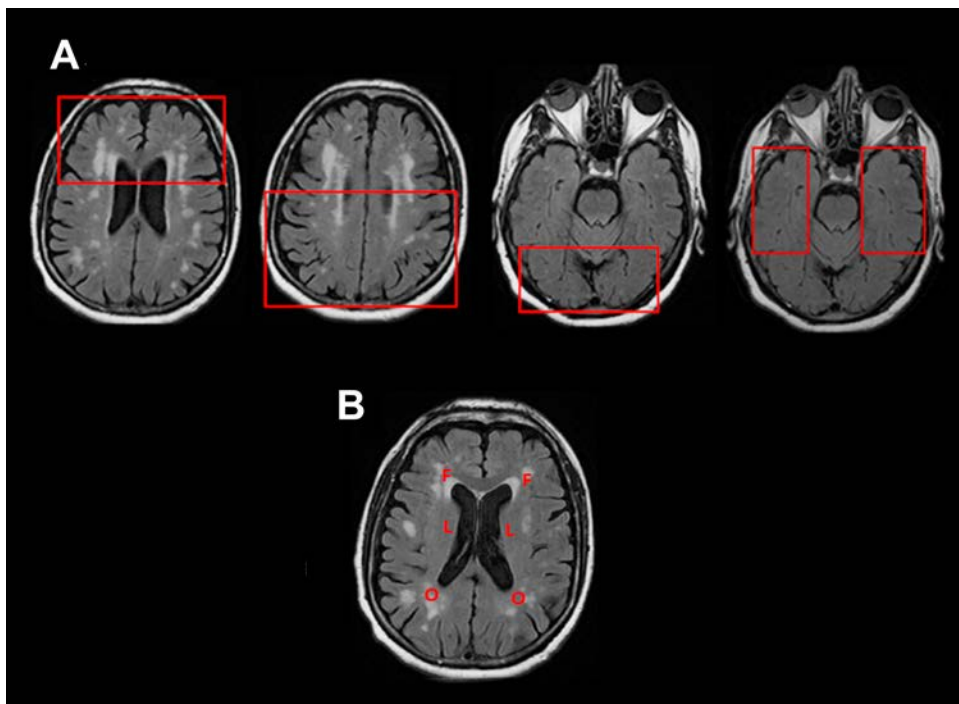
La evaluación de la progresión de las lesiones se realizó en 350 sujetos con RMC basal y de seguimiento. Todos los marcadores fueron evaluados por duplicado, considerando ambas resonancias en el momento de la evaluación y mediante evaluadores ciegos a la información clínica, así como al tiempo de adquisición de la RMC (basal o seguimiento). Los casos discordantes siempre fueron consensuados con un tercer evaluador.

## Métodos

Los nuevos infartos y MSC fueron determinados siguiendo los mismos criterios que en la visita basal.

En el caso de las LSB se realizó la evaluación cualitativa por medio de la escala de progresión de Rotterdam<sup>78</sup>. Esta escala evalúa la presencia, ausencia o regresión —puntuaciones de 1, 0 y -1, respectivamente— de cambio de las LSB a nivel periventricular y subcortical —definido como el aumento de tamaño de una lesión previa o la aparición de nuevos focos de lesiones—. A nivel periventricular se evalúa en 3 regiones (cuernos anteriores, posteriores y bandas laterales) en cada hemisferio, obteniendo una puntuación de -6 a 6. A nivel subcortical se evalúan en 4 regiones (lóbulos frontal, temporal, occipital y parietal) en cada hemisferio, obteniendo una puntuación de -8 a 8. En la figura 10 se muestra una representación de las diferentes áreas de interés en cada caso.

En cuanto a los EPVD, actualmente no existe ninguna escala publicada previamente. Así pues, para evaluar la progresión de este marcador se consideró como progresión un aumento en la puntuación de la escala de Potter en los ganglios de la base y/o el centro semioval. Por esta razón aquellos pacientes que presentaban una puntuación máxima en alguna región en la visita basal (puntuación de “4”) fueron excluidos de este análisis (se excluyeron 4 pacientes). El cambio en los EPVD se evaluó por separado en los ganglios de la base y en el centro semioval.



**Figura 10. Regiones anatómicas evaluadas en la escala de progresión de Rotterdam:** A) Regiones evaluadas considerando las LSB subcorticales. De izquierda a derecha podemos ver el lóbulo frontal, parietal, occipital y temporal. B) Regiones evaluadas considerando las LSB periventriculares. Las letras indican las astas frontales (F), las bandas laterales (L) y las astas occipitales (O).

### **3.3. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES**

El estudio de biomarcadores en sangre se ha llevado a cabo en dos fases. En una primera fase se ha realizado un descubrimiento de proteínas asociadas a la progresión de las LSB. La segunda fase ha tenido el objetivo de validar aquellos mejores candidatos descubiertos en la fase previa.

#### **3.3.1. Fase de descubrimiento**

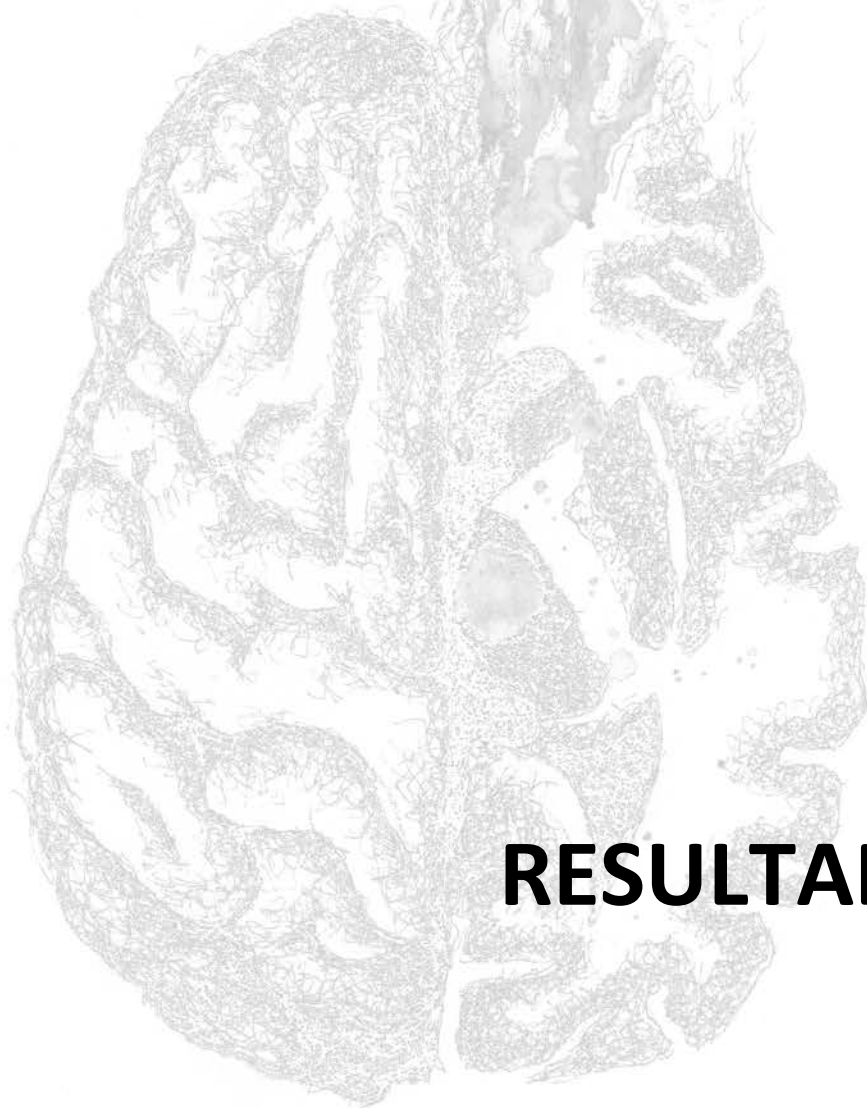
Para la fase de descubrimiento se ha utilizado una técnica proteómica basada en aptámeros. Los aptámeros son oligonucleótidos, cadenas simples de ácidos nucleicos, que debido a su estructura tridimensional se unen a moléculas diana con una alta sensibilidad y especificidad. La tecnología basada en aptámeros ha permitido reducir los costes de producción y mejorar la estabilidad respecto a otras técnicas de proteómica, como por ejemplo las basadas en anticuerpos, permitiendo estudiar un gran número de proteínas<sup>202</sup>.

Concretamente se ha utilizado la técnica SOMAscan (SomaLogic Inc., Boulder, CO, USA)<sup>203</sup>. Este ensayo permite evaluar 1305 proteínas en muestras de plasma por medio de SOMAmeros, que son aptámeros modificados y en los que se transduce la concentración de la proteína en señal de transcripción. Después de diferentes correcciones aplicadas según los protocolos de esta técnica se obtienen unidades de fluorescencia relativas<sup>204</sup>.

#### **3.3.2. Fase de validación**

El objetivo de esta fase ha sido determinar la concentración de aquellas proteínas más asociadas con la progresión de las LSB en la fase anterior. Para ello se ha utilizado la técnica ELISA que es un tipo de inmunoensayo en el cual un antígeno se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un cambio detectable, por ejemplo el cambio de color<sup>205</sup>.





# RESULTADOS



**Cognitive Impact Of Cerebral Small Vessel Disease Changes In Patients  
With Hypertension**

(Jiménez-Balado J, et al. Hypertension 2019, 73(2): 342-349)  
DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12090

---





**Ambulatory Blood Pressure Levels In The Prediction Of Progression Of  
Cerebral Small Vessel Disease**

(Jiménez-Balado J, et al. Manuscript under revision in Journal of American  
Geriatrics Society)

---



# AMBULATORY BLOOD PRESSURE LEVELS IN THE PREDICTION OF PROGRESSION OF CEREBRAL SMALL VESSEL DISEASE

Joan Jiménez-Balado<sup>a</sup>, Iolanda Riba-Llena<sup>a</sup>, Olga Maisterra<sup>a</sup>, Jesús Pizarro<sup>a</sup>, Antoni Palasi<sup>b</sup>, Francesc Pujadas<sup>b</sup>, Xavier Mundet<sup>c</sup>, Ernest Vinyoles<sup>c</sup>, Pilar Delgado<sup>a</sup>

- a) Neurovascular Research Lab. Vall Hebron Research Institute. Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona, Spain.
- b) Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona. Dementia Unit, Neurology Service. Barcelona, Spain.
- c) Primary Healthcare University Research Institute IDIAP Jordi Gol. Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona, Spain.

**Corresponding Author:** Dr. Pilar Delgado Martínez. Institut de Recerca Vall d'Hebron, Edifici Mediterrània, Planta 1<sup>a</sup>, Laboratori 123, Passeig Vall d'Hebron 119-129, CP 08035, Barcelona. 93/489 40 29. [pilar.delgado@vhir.org](mailto:pilar.delgado@vhir.org)

---

## ABSTRACT

**Aim:** We aimed to study the predictive usefulness of ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) in the global progression of cerebral small vessel disease (cSVD).

**Design:** Longitudinal Cohort Study

**Setting and Participants:** Data from ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives Study) cohort, a longitudinal population based study in subjects with hypertension, aged 50 to 70 and stroke-free at baseline. Patients underwent at the baseline and follow-up visits a magnetic resonance imaging and ABPM.

**Measurements:** Ambulatory systolic and diastolic blood pressure levels (SBP, DBP) were studied as continuous variables and dichotomized as good or poor control considering the following cutoffs: 125/75 (24h), 130/80 (day), 110/65 (night) mmHg.

Whole progression of cSVD was qualitatively evaluated granting 1 point when an incident lesion was detected —incident lacunar infarcts, deep cerebral microbleeds, white matter hyperintensities and basal ganglia enlarged perivascular spaces—, obtaining a score ranged from 0 to 4.

**Results:** We followed-up 233 participants with a median age of 65 (61-68) within 4 years. We detected that 61 (26.2%) and 23 (9.9%) subjects presented a progression of cSVD in 1 and  $\geq 2$  markers, respectively.

Baseline ambulatory SBP and DBP were positively correlated with number of incident lesions of cSVD. Furthermore, nighttime pulse pressure was associated with higher odds of progression. Interestingly, patients without incident lesions presented wider differences between office and ambulatory BP, suggestive of a white coat effect.

The most associated metric was baseline 24h DBP. Concretely, patients with a 24h DBP  $>75$  mmHg at baseline visit presented a 2.8 fold increased risk of progression of cSVD (CI95%=1.51-5.05. P-value=0.001). The inclusion of baseline 24h DBP in a clinical model resulted in an increase of the discrimination of patients with progression of cSVD (integrated discrimination improvement=4.49%, P-value<0.001).

**Conclusions:** ABPM may help to predict the progression of cSVD and stratify the risk of subjects with hypertension.

---

## INTRODUCTION

Cerebral small vessel disease (cSVD) refers to all the pathological processes which affect the small vessels of the brain<sup>1,2</sup>. Lacunar infarcts, deep cerebral microbleeds (CMB), white matter hyperintensities (WMH) and basal ganglia enlarged perivascular spaces (BG-EPVS) are considered the principal magnetic resonance imaging (MRI)-markers of age related cSVD. These lesions may accumulate on brain parenchyma over time and although the course of this progression is subclinical, they are associated with incident mild cognitive impairment<sup>3</sup>, stroke and increased mortality<sup>4</sup>.

One of the principal risk factors of age related cSVD is hypertension, which via sustained elevated blood pressure (BP) levels produces arteriosclerosis in small vessels and alterations in cerebrovascular function<sup>5</sup>. Other mechanisms as arterial stiffness may be also involved in the pathogenesis of small vessel disease<sup>6</sup>. However, BP measurements in the office are subject to different sources of bias<sup>7</sup>. By contrast, ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) provides a more reliable measure of BP with enhanced reproducibility over the clinic measurements<sup>8,9</sup>.

Several studies described associations of ABPM levels with individual MRI markers of cSVD<sup>8,10-12</sup> and total cSVD burden<sup>13,14</sup>. However, most results come from cross-sectional studies<sup>11-16</sup>. Considering that the progression of cSVD is a prevalent phenomenon in older adults with hypertension<sup>3</sup>, longitudinal studies assessing the relationship between ABPM levels and cSVD progression may be of greater interest.

We firstly aimed to construct a cSVD progression score. Secondly, we studied the relationship between serial ABPM measurements and this cSVD progression score — considering both baseline ambulatory recordings and changes in BP levels between visits—. Finally, we determined the usefulness of ABPM control, as defined by recent clinical guidelines<sup>17</sup>, in addition to clinical features in the prediction of cSVD progression.

## METHODS

Anonymized data will be shared following the request of qualified investigators for research purposes.

### Subjects

This investigation is nested within the ISSYS project (Investigating Silent Strokes in Hypertensive patients Study), which is an observational, longitudinal, prospective, and population based study aimed to assess the silent cerebrovascular lesions and determine its consequences in patients with hypertension<sup>18</sup>. Briefly,

inclusion criteria included (1) an age between 50 and 70 years at the baseline visit, (2) primary hypertension diagnosed at least 1 year earlier; (3) no previous history of stroke or dementia. Between 2010 and 2012 we randomly recruited 976 patients from 14 primary health care centers from Barcelona. Patients underwent, among others: a clinical data and vascular risk factor assessment, a brain MRI, office and ambulatory blood pressure measurements and blood and urine sampling. The follow-up visit was conducted between 2014 and 2016 in a sample of 361 individuals at higher risk of cSVD progression —defined as the presence of extensive WMH or silent brain infarcts<sup>3</sup>—.

For this study we selected 233 patients which underwent baseline and follow-up MRIs and had at least ABPM recordings at the baseline visit (Figure 1).

This study was in accordance with the declaration of Helsinki and it was approved by the local Ethics Committee. All patients signed their written informed consent before the inclusion at the baseline and follow-up visits.

### MRI characteristics

Patients underwent a brain MRI on the same 1.5 Tesla magnetic resonator at the baseline and follow-up visits (Signa HD x 1.5, General Electrics, Waukesha, WI). Our MRI protocol included a T1 and T2-weighted, Fluid Attenuated Inversion Recovery and gradient recalled echo sequences<sup>18</sup>.

### CSVD score at the baseline

At the baseline visit we rated several MRI markers of cSVD according to the Standards for Reporting Vascular Changes on Neuroimaging criteria<sup>19</sup>. Baseline total cSVD burden was estimated following a previously described scale<sup>14,20,21</sup>. This score evaluates the presence of lacunar infarcts, deep CMBs, extensive deep or periventricular WMH, and moderate to severe BG-EPVS.

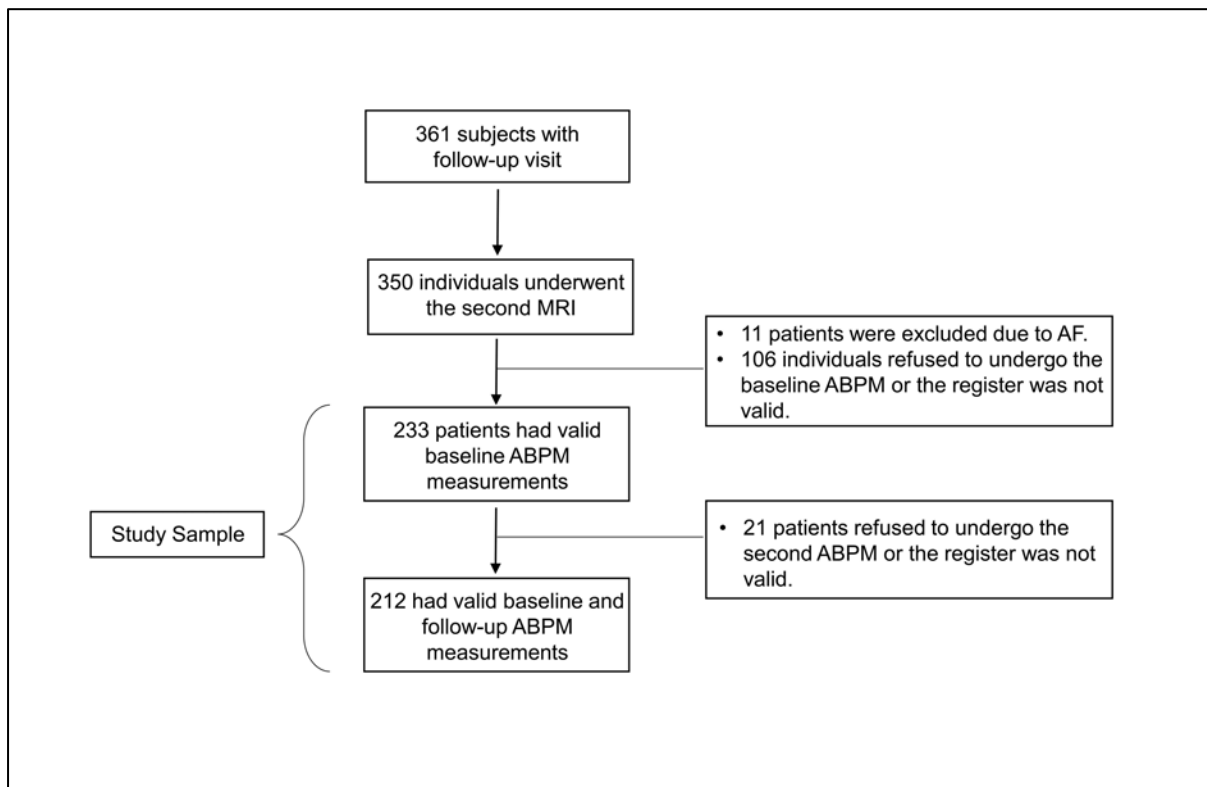


Figure 1: Flow-Chart of the sample.

### CSVD progression score

Changes in markers of cSVD were evaluated by duplicate and blinded to clinical data and the time of MRI acquisition. Discordant cases were agreed by consensus meeting with a third reader.

Similarly to the baseline cSVD burden score, we awarded 1 point when a progression in each of the following lesions was present: (1) incident lacunar infarcts; (2) incident deep CMBs; (3) a marked progression of WMH—as defined by a score  $>2.5$  in Rotterdam Progression Scale<sup>22, 23</sup>. Briefly, this scale qualitatively rates the recession, absence, or presence (score of -1, 0 or +1, respectively) of progression of WMH in a side-by-side manner at each hemisphere in different subcortical and periventricular regions. The total score ranges from -14 to 14; (4) change in BG-EPVS was considered as the increment between both MRIs in at least 1 category in a previous published scale—considering the slide and the side presenting the highest number of BG-EPVS and a better visualization of basal ganglia<sup>24</sup>. Patients who presented the highest BG-EPVS score at the baseline ( $>40$  EPVS) were excluded from the rating of this marker (2 cases). The kappa coefficient for inter-rater agreement in BG at baseline was 0.79 and at follow-up was 0.73.

Moreover we achieved a correct interrater and intrarater reliability in the assessment of all markers.

### Ambulatory and Office Blood Pressure Assessment

At baseline ( $n=233$ ) and follow-up ( $n=212$ ) visits—as represented in figure 1—, patients underwent at working days the 24 h ABPM with an automatic device (Spacelabs Healthcare, Issaquah, Washington), validated according to the protocol of the British Hypertension Society<sup>25</sup>. We used cuffs for obese patients when required. Participants were encouraged to follow their usual activities and to keep a record of their awake and sleeping periods. During daytime (06:00 to 22:59) readings were obtained every 20 minutes and during nighttime (23:00 to 05:59) every 30 minutes. We excluded those cases having less than 70% of valid measures, and those having less than 2 and 1 valid measurements per hour during daytime and nighttime periods, respectively.

Mean twenty-four-hours (24h), day and night systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) were obtained at both visits. Ambulatory pulse pressure (PP) was calculated as the difference between systolic and diastolic ABPM at each period (24h, day and night). ABPM control was defined at both visits according to the cutoffs of American

hypertension clinical guidelines<sup>17</sup>. Hence, poor SBP/DBP control at 24h, day and night periods was considered as those means equal or higher than 125/75, 130/80, 110/65, respectively. For this study we used both continuous and dichotomized ABPM measurements.

Office BP was measured at both visits via an oscillometric device (OMRON M6 Comfort) as the mean of the two last out of three measurements after 5 minutes rest. We additionally calculated the difference between office and daytime ambulatory SBP and DBP to obtain an estimate of the white coat effect.

### **Covariables**

We collected demographical and vascular risk factors information at the baseline and follow-up visits. We gathered information about the number of changes and drug classes (angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, thiazide-type diuretics, calcium channel-blockers, beta adrenergic blockers agents) during the follow-up period regarding the BP lowering treatment. Blood pressure lowering drugs (BPLD) compliance was measured by means of the Morisky-Green scale. This scale evaluates the medication-taking behavior in patients under antihypertensive treatment. The total score ranges from 0 to 4. Poor BPLD at any visit was defined as a score  $\geq 1$  in at least 1 assessment at the baseline and/or follow-up Morisky-Green scale.

### **Statistical Analysis**

All analyses were conducted using R software (R version 3.4.3, 2017-11-30; © 2017 The R Foundation for Statistical Computing).

cSVD progression score was categorized into none progression (0 markers), minor progression (1 marker), and marked progression ( $\geq 2$  markers). Changes in BP metrics were calculated by subtracting the follow-up mean BP from the respective baseline mean BP. Regarding ABPM control, we considered those patients having a poor ambulatory BP at the baseline or at both visits.

In univariate analyses we observed which variables were associated with the cSVD progression score by means of ANOVA, Kruskal-Wallis and  $\chi^2$  as appropriate. Differences between ABPM levels at the baseline and follow-up visits were measured via paired-samples T-test.

To study the relationship between the previously described ABPM parameters and the risk of total cSVD

progression burden, we conducted ordinal logistic regression models. In these models, the three-category progression score was introduced as the outcome. ABPM levels (continuous variables) and ABPM controls (binary variables) were introduced in separate models as determinants of interest. These models were adjusted by age, sex, number of changes and classes of BPLD, time between MRIs, poor BPLD compliance at any visit and baseline total cSVD burden. Two-way interactions were studied and included in the model when significant.

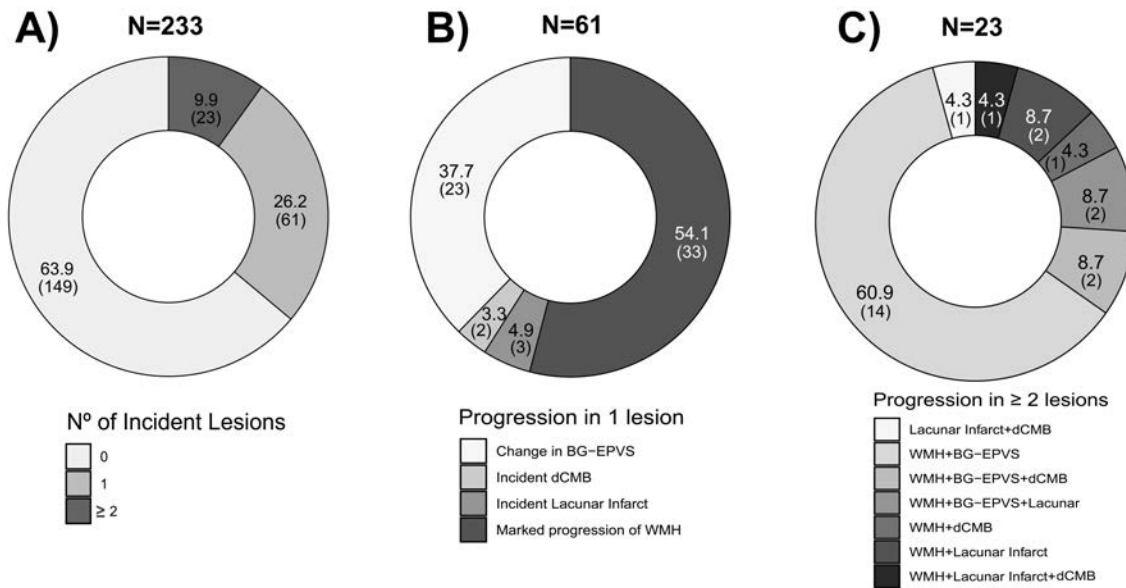
To know the clinical utility of ABPM in the prediction of cSVD progression, we subsequently categorized the cSVD progression score into a two-category variable —no progression (score of 0) vs presence of progression (score  $\geq 1$ )—. Backward stepwise binary logistic regression models were constructed introducing the same covariables as in the previous analysis. Predictors of interest were 24h SBP and DBP control at the baseline and both visits. We subsequently calculated the improvement of the addition of these ABPM parameters over a clinical model by means of the integrated discrimination index (IDI), which assesses the improvement in sensitivity as compared to the decrease in specificity by the addition of a new variable. Positive values indicate a better discrimination of the new model.

We additionally studied the effect of ABPM parameters in the progression of WMH. Therefore, we constructed multiple linear regression models entering the total RPS score (-14 to 14) as the outcome and adjusting by the same variables as in the previous models.

## **RESULTS**

### **Sample**

Median age of the sample was 65 (61-68), 43.8% were females and patients were followed-up for 4 years (3.8-4.5). Median time of hypertension diagnosis was 8 years (6-12). Regarding cSVD, 61 (26.2%) individuals showed a minor progression (1 MRI-marker) and 23 (9.9%) a marked progression ( $\geq 2$  markers). Regarding individual lesions, 55 (24.8%) participants presented a marked progression of WMH, 41 (18.3%) showed a change in BG-EPVS and 9 (3.9%) and 7 (3.0%) presented incident lacunar infarcts and deep CMBs, respectively. Among those patients presenting  $\geq 2$  MRI markers of cSVD progression, the most frequent combination of lesions was WMH and BG-EPVS, as showed in figure 2.



**Figure 2: CSVD progression score in the sample.**

Percentage and number of patients with incidental lesions according to the cSVD progression score in (A); Type of cSVD lesions in patients presenting progression in 1 MRI marker of cSVD in (B); Number and percentage of lesions combinations in patients presenting changes in  $\geq 2$  MRI markers of cSVD in (C).  
Key: BG-EPVS, basal ganglia enlarged perivascular spaces; dCMB, deep cerebral microbleeds; WMH, white matter hyperintensities.

**Table 1: Principal Characteristics of the Cohort by cSVD progression score (n=233)**

	None (n=149)	Minor* (n=61)	Marked* (n=23)	P-value
<b>Demographics</b>				
Baseline Age, years	65 (60;69)	65 (61;67)	64 (62;67)	0.970
Sex, Male	82 (55.0)	34 (55.7)	15 (65.2)	0.650
Time Between MRIs, years	4.0 (3.8;4.6)	4.0 (3.8;4.4)	4.0 (3.9;4.5)	0.333
<b>Baseline Vascular Risk Factors</b>				
Previous Ischemic Cardiopathy	17 (11.4)	9 (14.8)	3 (13.0)	0.800
Poor BPLD Compliance	68 (45.6)	30 (49.2)	14 (60.9)	0.390
Diabetes Mellitus	40 (26.9)	22 (36.1)	3 (13.0)	0.100
Active Smoker	18 (12.1)	8 (13.1)	3 (13.0)	0.970
Hypertension Duration, years	8 (5;11)	9 (6;16)	11 (6;12)	0.236
Total-Cholesterol, mg/dL	214.0 (40.5)	215.0 (42.0)	226.7 (44.5)	0.386
HDL-Cholesterol, mg/dL	47.2 (39.4;57.3)	47.2 (40.8;52.7)	46 (37.8;50.7)	0.506
Waist, cm	101.3 (10.5)	100.5 (12.1)	103.6 (9.0)	0.514
<b>Blood Pressure Lowering Drugs</b>				
Nº of Changes	1 (0;2)	1 (0;2)	1 (0;2)	0.210
Nº of Classes	2 (2;3)	3 (2;3)	2.5 (2;3)	0.114
<b>Baseline BP-Metrics</b>				
Office SBP, mm Hg	143.4 (16.6)	145.0 (19.3)	138.4 (14.1)	0.282
Office DBP, mm Hg	78.0 (9.6)	77.8 (10.2)	79.0 (7.6)	0.884
24h SBP, mm Hg	124.5 (11.5)	131.1 (14.3)	132.3 (13.9)	<0.001
24h DBP, mm Hg	75.0 (7.3)	78.1 (7.3)	80.3 (5.3)	<0.001
24h PP, mm Hg	49.3 (42.1;54.3)	49.8 (44.8;60.5)	52.9 (42.3; 58.2)	0.112
White Coat Effect SBP†	13.0 (14.2)	8.1 (14.6)	1.4 (8.7)	<0.001
White Coat Effect DBP†	-1.4 (8.0)	-4.9 (8.4)	-5.9 (5.8)	<0.001

Values represent mean (SD), median (Q1-Q3) or n% (%).

Key: BP, blood pressure; BPLD, blood pressure lowering drug; DBP, diastolic blood pressure; cSVD, cerebral small vessel disease; HDL, high density lipoprotein; MRI, magnetic resonance imaging; PP, pulse pressure; SD, standard deviation; SBP, systolic blood pressure.

\* Minor and Marked progression are defined as an increase in 1 or  $\geq 2$  MRI markers of cSVD.

† SBP and DBP white coat effects have been calculated as Office SBP minus Ambulatory Daytime SBP and Office DBP minus Ambulatory Daytime DBP, respectively.



Mean 24h and nighttime systolic BP increased significantly during the follow-up, while all diastolic metrics showed a decrease over time (all repeated measures tests P-values <0.05), thus, there was an increase of ambulatory PP within visits. However, these differences, although significant, were slight and the means of each metric at each visit showed a relative stability (supplementary figure S1).

In the univariate analysis, demographic and vascular risk factors information was not associated with cSVD progression score (table 1). Interestingly, we observed that as the white coat effect increased, the number of incident lesions decreased (supplementary figure S2).

#### Blood Pressure and cSVD progression score

Table 2 displays results regarding office and ambulatory BP levels (continuous variables) and the risk of cSVD progression. Higher baseline ambulatory SBP and DBP at any period was related to an increased risk of new cSVD lesions when we adjusted by potential confounders. Considering ambulatory PP, nighttime PP was associated with higher odds of incident lesions. Furthermore, we observed a higher white coat effect in subjects without progression of cSVD. By contrast, changes in ABPM or office measurements did not relate to this risk.

Regarding ambulatory BP control (dichotomized variables), as shown in table 3, a poor ambulatory baseline SBP and DBP control at any period was independently associated with the progression of cSVD. Similarly, poor control at both visits according to ABPM related to cSVD progression score considering all metrics, with the exception of daytime DBP.

We additionally studied the relationship between ABPM levels and the individual progression of WMH. In the supplementary table S1 we display these results. As observed, results were similar as those of the cSVD progression score. However, considering baseline ABPM levels we observed that while ambulatory nighttime SBP was associated with the increase of WMH, this was not observed considering daytime SBP.

**Table 2. Association of baseline and  $\Delta$ -BP metrics with the risk of progression of cSVD**

	OR (CI) by 10 mmHg	Pvalue
<b>Baseline BP measurements</b>		
<b>Office BP</b>		
SBP	0.91 (0.78;1.07)	0.299
DBP	0.98 (0.73;1.32)	0.907
<b>ABPM SBP</b>		
24h	1.36 (1.10;1.69)	0.008
Daytime	1.30 (1.05;1.61)	0.020
Nighttime	1.36 (1.12;1.66)	0.002
<b>ABPM DBP</b>		
24h	1.95 (1.27;3.01)	0.002
Daytime	1.94 (1.28;2.92)	0.002
Nighttime	1.68 (1.16;2.44)	0.006
<b>ABPM PP</b>		
24h	1.17 (0.91;1.51)	0.238
Daytime	1.08 (0.84;1.40)	0.526
Nighttime	1.30 (1.01;1.67)	0.039
<b>White Coat Effect</b>		
White Coat Effect SBP*	0.71 (0.57;0.87)	0.001
White Coat Effect DBP*	0.58 (0.40;0.84)	0.003
<b>Change in BP measurements</b>		
<b>Office BP</b>		
$\Delta$ SBP	1.09 (0.94;1.28)	0.225
$\Delta$ DBP	1.16 (0.85;1.59)	0.345
<b>ABPM SBP</b>		
$\Delta$ 24h	1.05 (0.88;1.25)	0.549
$\Delta$ Daytime	1.05 (0.90;1.23)	0.564
$\Delta$ Nighttime	1.02 (0.87;1.19)	0.787
<b>ABPM DBP</b>		
$\Delta$ 24h	1.06 (0.73;1.54)	0.761
$\Delta$ Daytime	0.99 (0.71;1.38)	0.940
$\Delta$ Nighttime	1.09 (0.80;1.50)	0.574
<b>ABPM PP</b>		
$\Delta$ 24h	1.11 (0.84;1.45)	0.471
$\Delta$ Daytime	1.14 (0.88;1.47)	0.333
$\Delta$ Nighttime	1.05 (0.82;1.36)	0.712

Ordinal logistic regression models have been constructed entering the cSVD progression score —none, minor or marked progression— as the outcome, and each BP metric as a determinant of interest in separate models. These models were adjusted by: baseline age, sex, number of changes and classes of BPLD, BPLD compliance and baseline cSVD burden score.

Key: ABPM, ambulatory blood pressure monitoring; BP, blood pressure; BPLD, blood pressure lowering drug; DBP, diastolic blood pressure; cSVD, cerebral small vessel disease; OR, odds ratio; SBP, systolic blood pressure.

## Clinical utility

In order to provide clinical insight, the cSVD progression score was dichotomized into no progression (score of 0) vs presence of progression (score  $\geq 1$ ). Among the clinical variables introduced in the model, only baseline cSVD burden remained significant after conducting the stepwise logistic regression analysis (OR=1.761, CI 95%=1.265-2.452. P-value=0.001), meaning that baseline cSVD burden is the unique predictor of progression in our model. When we subsequently added 24h SBP and DBP control, either baseline and considering both visits, only baseline DBP control remained significant (OR=2.76, CI 95%=1.51-5.05. P-value=0.001).

Predictive capacity of models containing or not ABPM information were compared by means of the IDI and this resulted in a significant improvement as observed in supplementary figure S3 (IDI=4.49%, CI 95%= 1.88-7.09. P-value<0.001).

**Table 3. Relationship between ABPM control and the risk of cSVD progression**

	Poor control at baseline	Poor control at both visits
	OR (CI)	OR (CI)
<b>SBP</b>		
24h	2.18 (1.20;3.98)*	2.21 (1.20;4.07)*
Daytime	1.83 (1.01;3.31)*	1.97 (1.07;3.62)*
Nighttime	2.48 (1.22;5.04)*	2.30 (1.21;4.34)*
<b>DBP</b>		
24h	3.12 (1.64;5.94)**	2.07 (1.08;3.94)*
Daytime	2.15 (1.17;3.96)*	1.35 (0.67;2.73)
Nighttime	2.42 (1.21;4.84)*	2.11 (1.14;3.89)*

Ordinal logistic regression models have been constructed entering the cSVD progression score —none, minor or marked progression— as the outcome, and each ABPM control as a predictor of interest. These models were adjusted by: baseline age, sex, number of BPLD changes and classes, baseline cSVD burden score, and BPLD compliance.

Values represent ORs for the presence of a poor control in each metric and 95% confidence interval.

\*P-value < 0.05.

\*\*P-value < 0.01.

## DISCUSSION

In this study we constructed a cSVD progression score and we found that 61 (26.2%) and 23 (9.9%) individuals showed progression in 1 marker and  $\geq 2$  markers, respectively. Our main finding is that individuals with a poor control of ABPM are at increased risk of progression of cSVD. Specifically, patients with a 24h DBP >75 mmHg at the baseline visit presented a 2.8 fold increased risk of incident lesions. The inclusion of 24h DBP in a clinical model

resulted in an improvement of discrimination of 4.49%, which corresponds to a significant but small increase of prediction of cSVD progression. This effect could be improved to be clinically meaningful by combining ABPM information with other clinically relevant variables in further studies, as blood biomarkers<sup>26</sup>. Similarly, higher nighttime pulse pressure was associated with incident lesions of cSVD. Finally, white coat effect was inversely correlated with the number of incident lesions.

The progression of cSVD is a prevalent phenomenon in patients with hypertension and it is involved in cognitive decline as well as increased risk of stroke, motor impairment, among other consequences<sup>1, 3</sup>. However, the use of serial MRI may not be a feasible method to detect this progression in routine clinical practice due to several reasons (e.g., high economic cost, time consuming method and MRI contraindications). ABPM may represent a useful source of information in order to identify which patients have higher odds of progression. Interestingly, patients with less progression showed larger differences between office and ambulatory BP measurements suggestive of a white coat effect. Concretely, in the group of subjects with no progression of cSVD office SBP was 13 mm Hg higher than ambulatory SBP, compared with 1.4 mm Hg higher in subjects with  $\geq 2$  incident lesions. Hence, office blood pressure assessment may not be a reliable method to stratify the risk of progression of cSVD. Similarly, the SPRINT trial found discrepancies between office and ambulatory BP even using an automated office BP measurement without the presence of a doctor<sup>27, 28</sup>. Furthermore, there is also a risk that a masked poor BP control exists —in fact, this was especially observed regarding ambulatory DBP in our setting—, which has been related to higher cardiovascular risk in previous research<sup>29</sup>. Therefore, these results indicate that ABPM, or possibly home blood pressure monitoring, should be more routinely obtained<sup>28</sup>.

On the other hand, change in ambulatory metrics did not relate to incident lesions. This may be explained by the fact that ABPM levels at each visit showed a relative stability and both recordings may be explaining the same information. However, a recent study underscored the influence of the regression to the mean, even in ambulatory BP measurements<sup>30</sup>. Hence, a single ABPM recording may not be sufficient, and serial measurements may help to discriminate which patients are at risk of progression of cSVD and which improved their BP levels.

Of note, in our study 24h DBP was more associated with incident lesions than 24h SBP. Our results are in line with a previous study that found 24h DBP associated with total cSVD burden independently of 24h SBP<sup>14</sup>. However, the relationship between cSVD and BP may depend on the neuroanatomical localization and the type of lesions<sup>31</sup>. For instance, we observed that nighttime, rather than daytime, ambulatory SBP was associated with the individual progression of WMH. These results are in line with previous literature, which conferred an especial importance to nighttime SBP in the burden of WMH<sup>32, 33</sup>.

We considered the new definitions of ABPM control according to recent clinical guidelines<sup>17</sup>. Interestingly, a previous meta-analysis study reported a linear relationship between BP levels and stroke risk, detecting that the benefit of hypertension reduction continues below the classic cutoff of 140/90 mmHg<sup>34</sup>. Furthermore, in the INFINITY and SPRINT trials an intensive lowering of ambulatory BP a follow-up resulted in a reduction of WMH progression<sup>35, 36</sup>. However, it is important to consider that other groups described a J-shaped association of BP levels with the risk of stroke<sup>37</sup>, cognitive decline and progression of WMH volume<sup>38</sup>. Therefore, it could exist a threshold below which may not be beneficial to reduce BP.

Finally, we observed that nighttime PP was positively correlated with the number of incident lesions of cSVD. Several cross-sectional studies related higher PP to burden of WMH<sup>12</sup>, although others did not confirm this association<sup>8</sup>. Higher PP is considered a surrogate marker of arterial stiffness, which has been consistently associated with microvascular disease<sup>39</sup>. However, a reduced number of research articles studied the temporal dynamics of arterial stiffness and progression of cSVD, finding discordant results<sup>40, 41</sup>. Hence, more research is needed in order to confirm our results.

This study presents several strengths and limitations. As limitations, change in BG-EPVS was measured according to the increment in Potter's Scale, since there is no progression scale available regarding this MRI marker. This method may not capture slight changes. It is also important to highlight that these results come from patients with hypertension and it has been described that cSVD is also prevalent in non-hypertensive subjects with other vascular risk factors<sup>42, 43</sup>. Therefore, further studies in general population should be conducted in order to confirm these results. Finally, due to MRI technical limitations we could not assess brain atrophy. Considering the relationship between brain volume and cSVD, future

research may include measures of cortical and subcortical atrophy in cSVD burden scores<sup>44, 45</sup>. As strengths, we provide novel longitudinal data regarding ABPM, cSVD and their interplay over time. Furthermore, we constructed a novel cSVD progression score which may be used in future investigations to estimate the total progression of cSVD.

## CONCLUSIONS

ABPM may provide relevant information in the prediction of the progression of cSVD. Among ambulatory BP metrics, baseline 24h DBP showed the most significant association with this progression. Patients with a 24h DBP >75 mmHg showed a 2.8 fold increased risk of progression of cSVD. Future studies should try to combine ABPM information with other clinical variables, as blood biomarkers, in order to refine risk prediction of cSVD progression in general population.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the collaboration of patients and their proxies in this study.

## Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest.

## Study Funding

This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III (grant numbers: PI14/01535, ICI14/307, CP15/00010 and JR15/00032), Incorporation of scientists and technicians to research groups (PERIS, SLT006/17/00266), AGAUR (FI\_DGR 2017, grant number 2017\_FI\_B 00064), with the support of the Secretary of Universities and Research of the Department of Economy and Knowledge (Generalitat de Catalunya) and cofinanced by the European Regional Development Fund. The neurovascular research lab receives funds from the Spanish research stroke network (RD/16/0019/0021).

## Author Contributions

PD, IRL and JJB designed the study. PD, IRL and JJB visited the patients. PD, IRL and JJB read the MRIs. JJB conducted the statistical analysis. PD, JJB, IRL, OM, JP and AP interpreted the results. JJB and PD wrote the manuscript. FP, OM, EV and XV made a critical revision of the manuscript for important intellectual content.

## Sponsor's Role

Not applicable.

## REFERENCES

1. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*. 2010;9: 689-701.
2. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications. *The Lancet Neurology*. 2019.
3. Jimenez-Balado J, Riba-Llena I, Abril O, et al. Cognitive Impact of Cerebral Small Vessel Disease Changes in Patients With Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2019;73: 342-349.
4. Rensma SP, van Sloten TT, Launer LJ, Stehouwer CDA. Cerebral small vessel disease and risk of incident stroke, dementia and depression, and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2018;90: 164-173.
5. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2013;62: 810-817.
6. Riba-Llena I, Jimenez-Balado J, Castane X, et al. Arterial Stiffness Is Associated With Basal Ganglia Enlarged Perivascular Spaces and Cerebral Small Vessel Disease Load. *Stroke*. 2018;49: 1279-1281.
7. Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2005;111: 697-716.
8. White WB, Jalil F, Wakefield DB, et al. Relationships among clinic, home, and ambulatory blood pressures with small vessel disease of the brain and functional status in older people with hypertension. *American heart journal*. 2018;205: 21-30.
9. Punzi HA. Why ambulatory blood pressure monitoring? *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 1998;55 Suppl 3: S12-16.
10. Yang S, Qin W, Yang L, et al. The relationship between ambulatory blood pressure variability and enlarged perivascular spaces: a cross-sectional study. *BMJ open*. 2017;7: e015719.
11. Staals J, van Oostenbrugge RJ, Knottnerus IL, Rouhl RP, Henskens LH, Lodder J. Brain microbleeds relate to higher ambulatory blood pressure levels in first-ever lacunar stroke patients. *Stroke*. 2009;40: 3264-3268.
12. Avet J, Pichot V, Barthelemy JC, et al. Leukoaraiosis and ambulatory blood pressure load in a healthy elderly cohort study: the PROOF study. *International journal of cardiology*. 2014;172: 59-63.
13. Yang S, Yuan J, Qin W, et al. Twenty-four-hour ambulatory blood pressure variability is associated with total magnetic resonance imaging burden of cerebral small-vessel disease. *Clinical interventions in aging*. 2018;13: 1419-1427.
14. Klarenbeek P, van Oostenbrugge RJ, Rouhl RP, Knottnerus IL, Staals J. Ambulatory blood pressure in patients with lacunar stroke: association with total MRI burden of cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2013;44: 2995-2999.
15. Klarenbeek P, van Oostenbrugge RJ, Lodder J, Rouhl RP, Knottnerus IL, Staals J. Higher ambulatory blood pressure relates to enlarged Virchow-Robin spaces in first-ever lacunar stroke patients. *Journal of neurology*. 2013;260: 115-121.
16. Henskens LH, Kroon AA, van Oostenbrugge RJ, et al. Associations of ambulatory blood pressure levels with white matter hyperintensity volumes in hypertensive patients. *Journal of hypertension*. 2009;27: 1446-1452.
17. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2018;138: e426-e483.
18. Riba-Llena I, Jarca CI, Mundet X, et al. Investigating silent strokes in hypertensives: a magnetic resonance imaging study (ISSYS): rationale and protocol design. *BMC neurology*. 2013;13: 130.
19. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease:

insights from neuroimaging. *The Lancet Neurology*. 2013;12: 483-497.

20. Staals J, Booth T, Morris Z, et al. Total MRI load of cerebral small vessel disease and cognitive ability in older people. *Neurobiology of aging*. 2015;36: 2806-2811.

21. Vilar-Bergua A, Riba-Llena I, Ramos N, et al. Microalbuminuria and the Combination of MRI Markers of Cerebral Small Vessel Disease. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2016;42: 66-72.

22. Prins ND, van Straaten EC, van Dijk EJ, et al. Measuring progression of cerebral white matter lesions on MRI: visual rating and volumetrics. *Neurology*. 2004;62: 1533-1539.

23. van Dijk EJ, Prins ND, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Progression of cerebral small vessel disease in relation to risk factors and cognitive consequences: Rotterdam Scan study. *Stroke*. 2008;39: 2712-2719.

24. Potter GM, Chappell FM, Morris Z, Wardlaw JM. Cerebral perivascular spaces visible on magnetic resonance imaging: development of a qualitative rating scale and its observer reliability. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2015;39: 224-231.

25. O'Brien E, Petrie J, Littler W, et al. The British Hypertension Society protocol for the evaluation of automated and semi-automated blood pressure measuring devices with special reference to ambulatory systems. *Journal of hypertension*. 1990;8: 607-619.

26. Vilar-Bergua A, Riba-Llena I, Nafria C, et al. Blood and CSF biomarkers in brain subcortical ischemic vascular disease: Involved pathways and clinical applicability. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36: 55-71.

27. Drawz PE, Pajewski NM, Bates JT, et al. Effect of Intensive Versus Standard Clinic-Based Hypertension Management on Ambulatory Blood Pressure: Results From the SPRINT (Systolic Blood Pressure Intervention Trial) Ambulatory Blood Pressure Study. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2017;69: 42-50.

28. Kario K. PREFACE: "The Lower the Better" Association between White-coat Effect-excluded

Blood Pressure and Cardiovascular Events in High-risk Hypertension: Insights from SPRINT. *Curr Hypertens Rev*. 2016;12: 2-10.

29. Kario K, Saito I, Kushiro T, et al. Home blood pressure and cardiovascular outcomes in patients during antihypertensive therapy: primary results of HONEST, a large-scale prospective, real-world observational study. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2014;64: 989-996.

30. Moore MN, Atkins ER, Salam A, et al. Regression to the mean of repeated ambulatory blood pressure monitoring in five studies. *Journal of hypertension*. 2019;37: 24-29.

31. Blanco PJ, Muller LO, Spence JD. Blood pressure gradients in cerebral arteries: a clue to pathogenesis of cerebral small vessel disease. 2017;2: 108-117.

32. Kokubo M, Shimizu A, Mitsui T, et al. Impact of night-time blood pressure on cerebral white matter hyperintensity in elderly hypertensive patients. *Geriatrics & gerontology international*. 2015;15 Suppl 1: 59-65.

33. Nakanishi K, Jin Z, Homma S, et al. Night-time systolic blood pressure and subclinical cerebrovascular disease: the Cardiovascular Abnormalities and Brain Lesions (CABL) study. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2019.

34. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet (London, England)*. 2002;360: 1903-1913.

35. Group SMiftSR, Nasrallah IM, Pajewski NM, et al. Association of Intensive vs Standard Blood Pressure Control With Cerebral White Matter Lesions. *Jama*. 2019;322: 524-534.

36. White WB, Wakefield DB, Moscufo N, et al. Effects of Intensive Versus Standard Ambulatory Blood Pressure Control on Cerebrovascular Outcomes in Older People (INFINITY). *Circulation*. 2019.

37. Park JH, Ovbiagele B. Post-stroke diastolic blood pressure and risk of recurrent vascular events. *European journal of neurology*. 2017;24: 1416-1423.

38. Peng J, Lu F, Wang Z, et al. Excessive lowering of blood pressure is not beneficial for progression of brain white matter hyperintensive and

cognitive impairment in elderly hypertensive patients: 4-year follow-up study. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2014;15: 904-910.

39. van Sloten TT, Protogerou AD, Henry RMA, Schram MT, Launer LJ, Stehouwer CDA. Association between arterial stiffness, cerebral small vessel disease and cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2015;53: 121-130.

40. Verhaaren BF, Vernooij MW, de Boer R, et al. High blood pressure and cerebral white matter lesion progression in the general population. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2013;61: 1354-1359.

41. Tsao CW, Himali JJ, Beiser AS, et al. Association of arterial stiffness with progression of subclinical brain and cognitive disease. *Neurology*. 2016;86: 619-626.

42. Arboix A, Roig H, Rossich R, Martinez EM, Garcia-Eroles L. Differences between hypertensive and non-hypertensive ischemic stroke. *European journal of neurology*. 2004;11: 687-692.

43. Arboix A, Blanco-Rojas L, Martí-Vilalta JL. Advancements in understanding the mechanisms of symptomatic lacunar ischemic stroke: translation of knowledge to prevention strategies. *Expert review of neurotherapeutics*. 2014;14: 261-276.

44. Grau-Olivares M, Arboix A, Junque C, Arenaza-Urquijo EM, Rovira M, Bartres-Faz D. Progressive gray matter atrophy in lacunar patients with vascular mild cognitive impairment. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2010;30: 157-166.

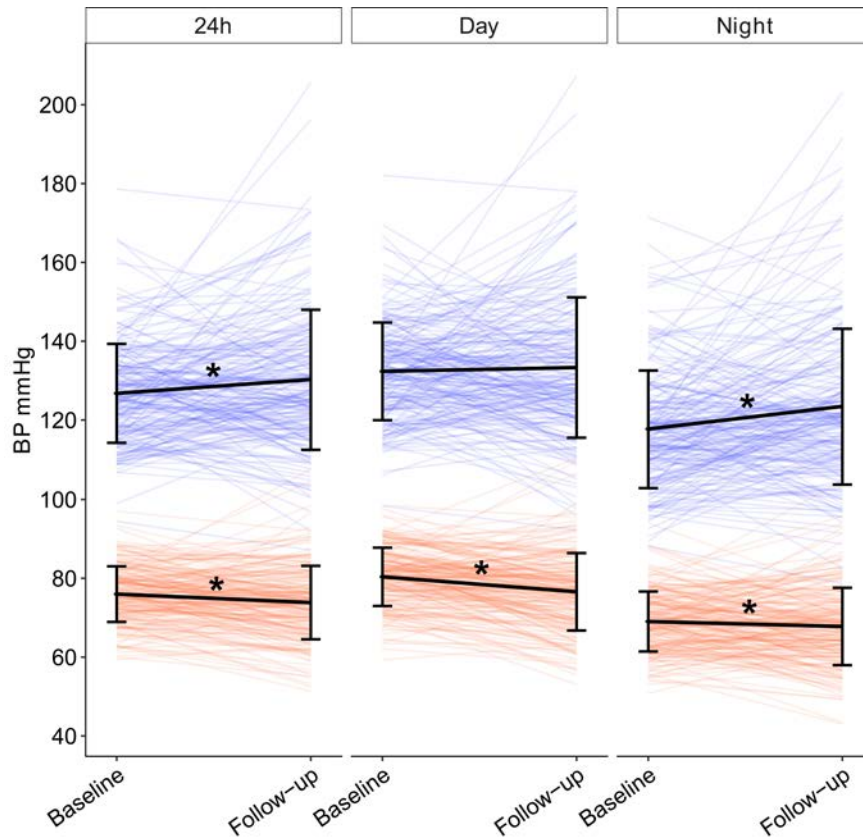
45. Smith EE, Arboix A. Focal cortical thinning is caused by remote subcortical infarcts: spooky action at a distance. *Neurology*. 2012;79: 2016-2017.



## AMBULATORY BLOOD PRESSURE LEVELS IN THE PREDICTION OF PROGRESSION OF CEREBRAL SMALL VESSEL DISEASE

Joan Jiménez-Balado, Iolanda Riba-Llena, Olga Maisterra, Jesús Pizarro, Antoni Palasí, Francesc Pujadas, Xavier Mundet, Ernest Vinyoles, Pilar Delgado

### SUPPLEMENTARY MATERIAL



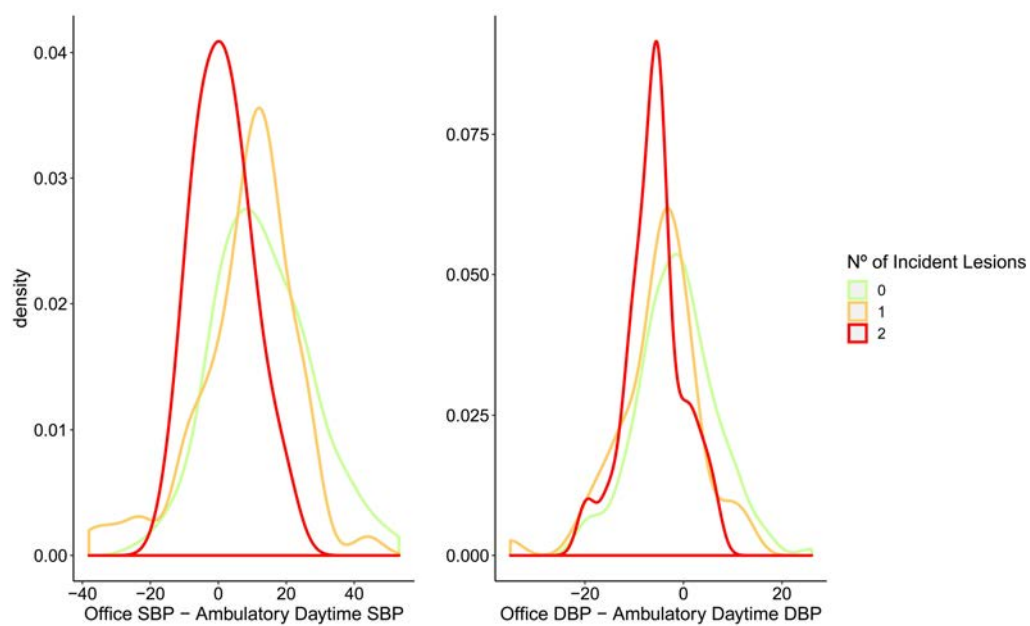
**Supplementary Figure S1: Changes of ABPM levels from baseline to follow-up visit.**

Thin lines represent change in ABPM levels from baseline to follow-up visit for each patient in SBP (blue) and DBP (red). Solid black lines indicate mean SBP and DBP at each visit. Solid black whiskers show the standard error of the mean for each metric at each visit.

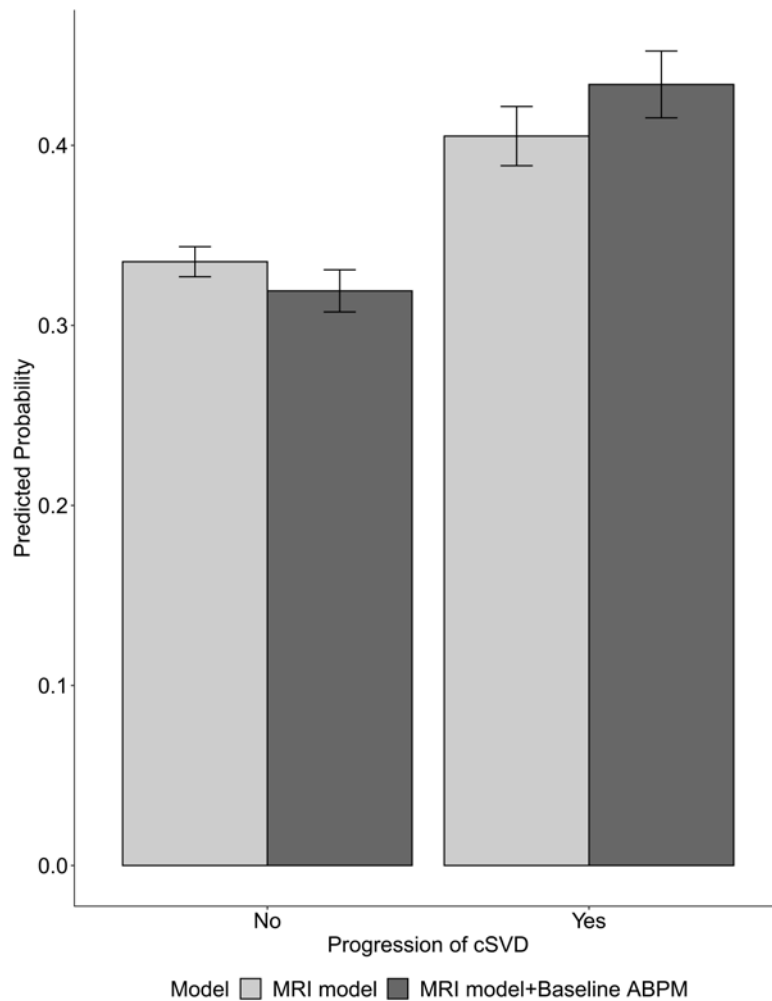
\* indicate repeated measurements P-value<0.05

Key: ABPM, ambulatory blood pressure monitoring; DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure.





**Supplementary Figure S2: Distribution of white coat effect estimation by progression of cSVD.** Lines represent the density functions in patients presenting no progression of cSVD (green), 1 incident lesion (orange) and  $\geq 2$  incident lesions (red).



**Supplementary Figure S3: Improvement of baseline ABPM information in the prediction of cSVD.**

Graphical representation of the Integrated Discrimination Improvement Index. Bars show the mean risk (%) for each predictive model (grey: MRI model; dark grey: MRI model+ABPM information) of patients with and without cSVD progression —as defined by the presence of change in at least 1 marker of cSVD—.

IDI=4.49%, CI 95%= 1.88-7.09. P-value<0.001.

Increase in sensibility=2.87%.

Increase in specificity=1.62%.

Key: ABPM, ambulatory blood pressure monitoring; cSVD, cerebral small vessel disease; IDI, Integrated Discrimination Improvement Index; MRI, magnetic resonance imaging.

**Supplementary Table S1. Association of baseline and  $\Delta$ -BP metrics with progression of WMH**

	$\beta$ (CI) by 10 mmHg	P-value
<b>Baseline BP measurements</b>		
<b>Office BP</b>		
SBP	-0.06 (-0.25;0.13)	0.507
DBP	0.13 (-0.21;0.48)	0.452
<b>ABPM SBP</b>		
24h	0.27 (0.02;0.53)	0.034
Daytime	0.20 (-0.04;0.45)	0.107
Nighttime	0.3 (0.09;0.52)	0.006
<b>ABPM DBP</b>		
24h	0.85 (0.39;1.32)	<0.001
Daytime	0.75 (0.31;1.19)	0.001
Nighttime	0.69 (0.28;1.10)	0.001
<b>ABPM PP</b>		
24h	0.04 (-0.26;0.34)	0.79
Daytime	-0.04 (-0.33;0.25)	0.789
Nighttime	0.19 (-0.10;0.48)	0.191
<b>White Coat Effect</b>		
White Coat Effect SBP*	-0.26 (-0.49;-0.04)	0.023
White Coat Effect DBP*	-0.41 (-0.81;-0.02)	0.040
<b>Change in BP measurements</b>		
<b>Office BP</b>		
$\Delta$ SBP	0.17 (0.00;0.35)	0.054
$\Delta$ DBP	0.31 (-0.04;0.65)	0.082
<b>ABPM SBP</b>		
$\Delta$ 24h	0.11 (-0.08;0.3)	0.249
$\Delta$ Daytime	0.11 (-0.07;0.29)	0.221
$\Delta$ Nighttime	0.06 (-0.12;0.23)	0.507
<b>ABPM DBP</b>		
$\Delta$ 24h	0.32 (-0.08;0.71)	0.113
$\Delta$ Daytime	0.24 (-0.13;0.61)	0.202
$\Delta$ Nighttime	0.27 (-0.07;0.6)	0.117
<b>ABPM PP</b>		
$\Delta$ 24h	0.1 (-0.21;0.4)	0.533
$\Delta$ Daytime	0.14 (-0.15;0.42)	0.341
$\Delta$ Nighttime	0.01 (-0.27;0.28)	0.962

Multiple linear regression models have been constructed entering the progression of white matter hyperintensities (Total RPS score: -14 to 14) as the outcome, and each BP metric as a determinant of interest in separate models. These models were adjusted by: baseline age, sex, number of changes and classes of BPLD, BPLD compliance and baseline cSVD burden score.

Values represent  $\beta$  for 10 mmHg increase and 95% confidence interval.

\* SBP and DBP white coat effects have been calculated as Office SBP minus Ambulatory Daytime SBP and Office DBP minus Ambulatory Daytime DBP, respectively.

Key: ABPM, ambulatory blood pressure monitoring; BP, blood pressure; BPLD, blood pressure lowering drug; DBP, diastolic blood pressure; CI, confidence interval; cSVD, cerebral small vessel disease; OR, odds ratio; RPS, Rotterdam progression scale; SBP, systolic blood pressure.







**Kidney Function And Its Relation With The Progression Of Cerebral Small  
Vessel Disease And Cognitive Decline**

(Jiménez-Balado J, et al. Journal of the Neurological Sciences 2019, 409)  
DOI: 10.1016/j.jns.2019.116635

---





**New Biomarker Candidates In The Prediction And Monitoring Of White  
Matter Hyperintensities Progression**

(Jiménez-Balado J, et al. Manuscript under revision)

---



# NEW BIOMARKER CANDIDATES IN THE PREDICTION AND MONITORING OF WHITE MATTER HYPERINTENSITIES PROGRESSION

Joan Jiménez-Balado<sup>a</sup>, Jesús Pizarro<sup>a</sup>, Iolanda Riba-Llena<sup>a</sup>, Anna Penalba<sup>a</sup>, Julia Faura<sup>a</sup>, Elena Palà<sup>a</sup>, Joan Montaner<sup>a</sup>, Mar Hernández-Guillamon<sup>a</sup>, Pilar Delgado<sup>b</sup>.

- a) Neurovascular Research Lab. Vall Hebron Research Institute. Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona, Spain.
- b) Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona. Dementia Unit, Neurology Service. Barcelona, Spain.

**Corresponding Author:** Dr. Pilar Delgado Martínez. Institut de Recerca Vall d'Hebron, Edifici Mediterrània, Planta 1<sup>a</sup>, Laboratori 123, Passeig Vall d'Hebron 119-129, CP 08035, Barcelona. 93/489 40 29. [pilar.delgado@vhir.org](mailto:pilar.delgado@vhir.org)

---

## Abstract

**Aim:** We aimed to discover blood biomarkers associated with the progression of white matter hyperintensities (WMH).

**Methods:** This study was divided into a discovery and replication phases. Subjects from both studies were patients with hypertension aged 50-70 from a longitudinal cohort study. All individuals underwent a brain MRI at baseline (2010-2012) and follow-up visits (2014-2016), and WMH progression was qualitatively assessed.

In the discovery phase we performed a screening of 1305 proteins in baseline plasma samples of 24 subjects —12 cases with progression of WMH and 12 matched controls— via an aptamer-based assay (SOMAscan).

We subsequently selected three candidates to replicate in baseline and follow-up blood samples of 80 cases and 80 controls. In this replication phase biomarker concentration was determined by ELISA.

**Results:** In the discovery phase there were 41 significant proteins—13 were upregulated and 28 downregulated—. Selected candidates were: MMP9 (upregulated in cases), and MET and ASAH2 (both downregulated in cases).

In the replication sample median age was 65 [62-68] and 43.8% were women. Baseline biomarkers concentrations did not predict the progression of WMH, and we only observed a borderline association regarding MMP9 (P-value=0.06). By contrast, patients with progression of WMH presented a steeper decline in MET concentration within visits ( $\beta$  [95%CI], -6.77 [-1.68 to -11.87]. P-value=0.01). Furthermore, cases showed a higher concentration of MMP9 and a lower concentration of ASAH2 at the follow-up visit as compared to controls.

**Conclusions:** Patients with progression of WMH presented different temporal profiles regarding MET, MMP9 and ASAH2. Hence, these may be interesting biomarkers to validate in future studies.

---

## INTRODUCTION

White matter hyperintensities (WMH) are one of the principal hallmarks of cerebral small vessel disease<sup>1,2</sup>. Radiologically, WMH appear as hyperintense signal lesions in T2 and FLAIR-weighted sequences<sup>3</sup>, which in most cases reflect demyelination and axonal loss as a consequence of sustained exposition to vascular risk factors<sup>4,5</sup>.

In the last years many longitudinal studies reported substantial rates of progression of WMH over few years of follow-up<sup>6</sup>, which can be increased in the presence of hypertension<sup>7</sup>. This progression behaves as a subclinical disease in which WMH conflate on brain parenchyma over time. However, previous literature described that these radiological changes, although subclinical, correlate with decline in cognition<sup>7</sup>, motor function<sup>8</sup>, among other consequences. Nevertheless, nowadays the mechanisms implicated in the rhythm of progression of WMH are poorly understood and, considering the long covert stage of this disease, to understand its pathophysiology may help to prevent or delay these consequences<sup>2</sup>.

In this regard, the study of blood biomarkers may help to achieve a better understanding of WMH pathogenesis and to obtain new useful diagnostic and prognostic tools, which may be of interest considering that nowadays cSVD can only be quantified via brain MRI<sup>9</sup>. Many cross-sectional studies investigated the relationship between WMH burden and blood biomarkers. Specifically, most studies found WMH volume associated with markers of endothelial dysfunction<sup>10-13</sup>, inflammation<sup>14, 15</sup>, lipid metabolism<sup>16</sup>, hemostasis<sup>17</sup>, among other processes. Altogether, it is accepted that these biological mechanisms are implicated in the pathophysiology of WMH, but their role and significance in the progression of WMH remains unclear. Moreover, although WMH should be understood as a dynamic disorder<sup>2</sup>, the biological mechanisms implicated in

cSVD have been rarely studied in longitudinal studies with a quantification of progression of WMH.

This longitudinal population-based study aimed to find biomarkers associated with the progression of WMH in patients with hypertension. For that purpose, first we conducted a discovery analysis in the plasma proteome of subjects with and without progression of WMH in order to find related proteins. We subsequently conducted a replication experiment of the best candidates selected in the previous phase.

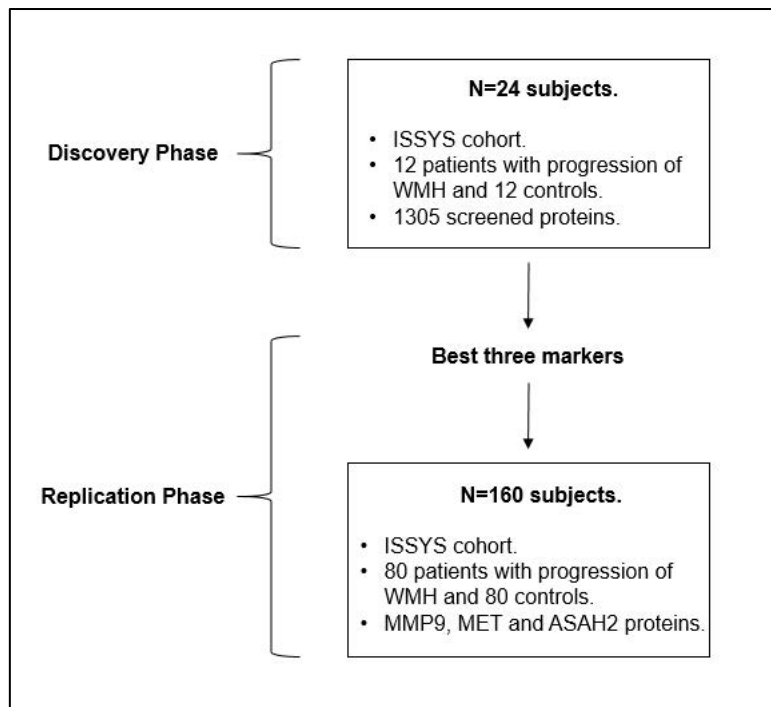
## METHODS

### Subjects

This study was split in two phases: a discovery and a replication phase. Patients at both stages were recruited from the ISSYS longitudinal cohort (Investigating Silent Strokes in Hypertensive patients, a magnetic resonance imaging Study)<sup>7,18</sup>. This cohort consists of 350 individuals with hypertension and aged 50 to 70, which underwent two MRIs and two blood sampling collections: one at baseline (2010-2012) and one at follow-up visits (2014-2016)<sup>7</sup>. All subjects were free of dementia and stroke at the baseline visit.

In the discovery phase we selected 12 cases with progression of WMH and 12 controls matched by age, sex and baseline WMH burden to conduct a proteomic experiment. Selected markers from the discovery phase were replicated in a sample consisting of 80 cases with progression of WMH and 80 controls paired by age and sex. Among these subjects, 22 out of 24 subjects from the discovery phase were also included in the replication phase. In figure 1 we show a graphical representation of the study design.

This study was in accordance with the declaration of Helsinki and it was approved by the local Ethics Committee. All patients signed their written informed consent before the inclusion at the baseline and follow-up visits.



**Figure 1: Study design and number of patients in each phase.**

Discovery and replication phases were conducted within ISSYS cohort —patients with hypertension aged 50 to 70, and without dementia and stroke at the baseline visit—. In both studies progression of WMH was defined as a total RPS score  $\geq 3$ .

Key: ASAH2, Neutral ceramidase; ISSYS, Investigating Silent Strokes in hYpertensives Study; MET, Hepatocyte growth factor receptor; MMP9, Matrix metalloproteinase-9; RPS, Rotterdam progression scale; WMH, white matter hyperintensities.

### Case and control definitions

Patients underwent a brain MRI at both visits on the same 1.5 Tesla magnetic resonator (Signa HD x 1.5, General Electrics, Waukeska, WI). Our MRI protocol has been previously described<sup>18</sup>.

Baseline WMH at periventricular and subcortical areas were quantified according to Fazeka's scale<sup>19</sup>. Presence of baseline extensive WMH was defined as a score in Fazeka's scale  $\geq 2$  at periventricular and/or subcortical areas.

Progression of WMH was measured according to Rotterdam Progression Scale (RPS). Briefly, this scale quantifies the qualitative change in WMH at subcortical and periventricular regions<sup>4</sup>. Total RPS-score ranges from -14 to 14.

At both experiments —discovery and replication phases— cases with progression were considered as those subjects showing a total RPS-score  $\geq 3$ <sup>20</sup>. Otherwise, individuals were considered as controls.

### Sample Processing

Blood samples were drawn from each participant at both visits. Serum and plasma were obtained after 15 min centrifugation at 3500 RPM and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### Discovery phase

The discovery study was performed by means of SOMAscan (SomaLogic Inc., Boulder, CO, USA), which is an aptamer-based proteomic assay<sup>21</sup>. In this assay 1305 protein analytes were measured in baseline plasma samples (100  $\mu\text{l}$  each) of 12 cases and 12 controls. This approach uses SOMAMers, which are modified nucleic acid aptamers, to convert a protein signal to a nucleotide signal which is quantified using relative fluorescence on microarrays. Units represent relative fluorescence units (RFU). All samples passed quality controls. Three different dilutions were performed to separate groups of high, medium and low abundance of proteins. Normalization and calibration procedures are conducted in order to remove systematic error in raw data following the SOMAscan protocol<sup>22</sup>.

### Replication phase

Selected candidates in the discovery phase (Matrix metalloproteinase-9 [MMP9]; Hepatocyte growth factor receptor [MET]; Neutral ceramidase [ASAH2]) were measured in baseline and follow-up samples of 80 cases and 80 controls by means of quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Specifically, MMP9 was measured by human MMP9 ELISA assay (GE healthcare, Chicago, Illinois) in plasma

samples. MET and ASAH2 were measured using Human MET/ASAH2 ELISA kits (Cloud-Clone Corp, Houston, USA) in serum samples. All samples were measured using the same ELISA kit badges for each protein. Assays were conducted according to data sheet manufacturer for all the markers. Moreover, the sample concentration of each molecule was measured by duplicated and the mean of both values were used in data analyses. Those samples with duplicated values showing a coefficient of variation (CV) higher than 20% were excluded from the analysis. Plate to plate variation was assessed including a commercial sample pool in each plate and calculating the CV between plates.

### Covariable

Demographic and vascular risk factors information were collected at the baseline and follow-up visits. Mean systolic and diastolic blood pressures were calculated as the mean of two out of three measurements after 5 minutes rest at both visits. Cholesterol and High Density Lipoprotein (HDL)-cholesterol were measured automatically via a clinical analyzer (Olympus AU 2007).

### Statistics

All analyses were conducted using R software (R version 3.4.3, 2017-11-30; © 2017 The R Foundation for Statistical Computing).

Characteristics of individuals with progression of WMH and individuals without progression were compared by means of T-test, U Mann-Whitney or  $\chi^2$  depending on the type and distribution of the variable. To analyze the change within visits in biomarker concentrations of the replication phase we used paired samples T-tests.

For the discovery study, proteomic data was analyzed using the “limma” package (Bioconductor) version 3.34.9<sup>23</sup>. This package allows to analyze data from omics experiments in an efficient way. First, proteins from SOMAscan array (n=1305) were log-transformed since they presented a skewed distribution. Then, Bayes models were constructed for each feature introducing the phenotype (cases versus controls) as the predictor variable. The log fold change (LogFC) indicates whether a protein is up or downregulated in cases. P-values were adjusted by the false discovery rate (FDR). Finally, we conducted a ranked enrichment analysis for pathways (Reactome) and for molecular functions and biological processes (Gene Ontologies [GO]) considering the full SOMAscan data arranged by T-statistic, according to a previous

protocol<sup>24</sup>. This analysis was conducted by means of GSEA<sup>25</sup> software (Gene Set Enrichment Analysis ©, 2004-2020; Broad Institute, Inc., Massachusetts Institute of Technology, and Regents of the University of California) and results were visualized via Cytoscape (© 2001-2018 Cytoscape Consortium)<sup>26</sup> following a previously published protocol<sup>24</sup>. Significant pathways at exploratory level were considered at q-value<0.25<sup>24</sup>.

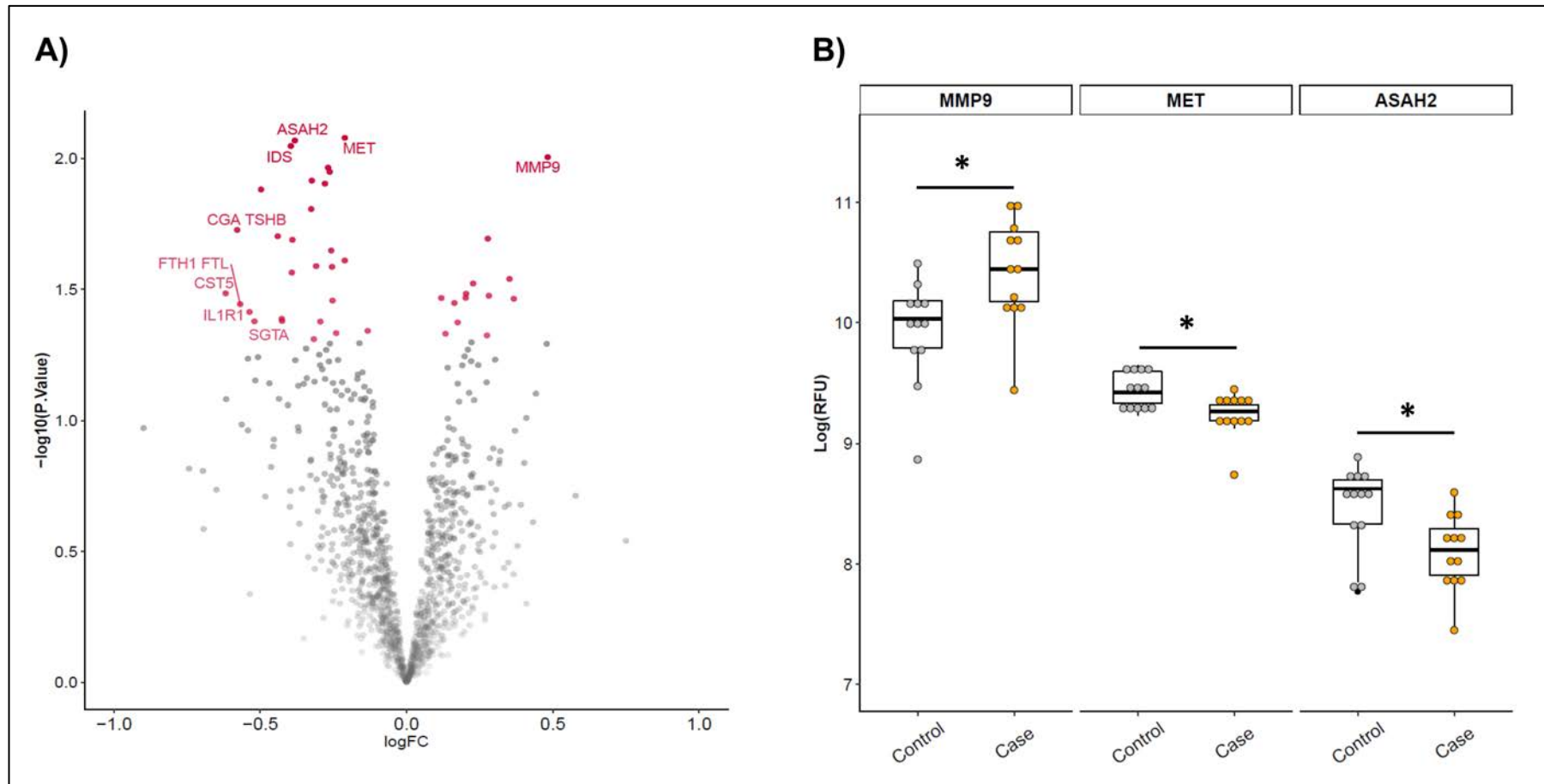
For the replication phase, we compared the differences between and within visits in the biomarker concentration by group —subjects with progression of WMH and subjects without—. Therefore, we constructed mixed-models for each marker in which group was introduced as the predictor variable of interest. Covariables were selected according to whether they were associated with our biomarker candidates or with the progression of WMH (p-value cutoff <0.1). Therefore, we adjusted by sex, baseline age, systolic blood pressure, visit (baseline vs follow-up) and baseline burden of WMH. The rate of change between cases and controls in each marker was compared by the coefficient interaction between time and group. Random intercepts were introduced for subject id. Random slopes were not considered since we determined biomarker concentrations just in two points of time.

## RESULTS

### Discovery Phase

Median age of the discovery sample was 64 (62-67) (n=24). Among the screened markers, 41 of them were associated with the progression of WMH at a nominal p-value<0.05 —13 proteins were upregulated and 28 downregulated—. Among them, 4 markers showed a nominal P-value <0.01: MET, ASAH-2, iduronate 2-sulfatase (IDS) and MMP9. Concretely, MET, ASAH-2 and IDS were downregulated and MMP9 was upregulated. No protein remained significant after FDR-correction. In figure 2-A we show the volcano plot of this analysis.

After reviewing the bibliography, MMP9, MET and ASAH-2 were selected as biomarkers to replicate, since these candidates have been previously related to cerebrovascular or other neurological diseases. In figure 2-B we show the boxplots representing differences in baseline RFU between cases and controls. LogFCs of MMP9, MET and ASAH2 were 0.48, -0.21, -0.38, respectively.



**Figure 2. Discovery Phase Results.**

A) Volcano plot of the discovery study. Color and opacity indicate whether features had a significant nominal p-value (red and opaque) or not significant (grey and transparent). Labeled features are those with a nominal p-value < 0.05 and  $|\log_{FC}| > 0.5$  or p-value < 0.01. **B) Boxplots of RFU levels of the three selected candidates to replicate from the discovery study (N=24).** Y axis represents  $\log(\text{RFU})$  and X axis represents the group — controls (grey) and cases (orange) —.

\*: P-value < 0.01.

Key: ASA2H, Neutral ceramidase; MET, Hepatocyte growth factor receptor; MMP9, Matrix metalloproteinase-9; RFU, relative fluorescence units.



Regarding the enrichment analysis, we found significant enrichment (at  $q$ -value $<0.25$ ) of proteins related to 2 GO biological processes pathways, 21 considering GO molecular function and 5 Reactome pathways. As showed in the supplementary figure 1, these pathways included ubiquitous processes as specific DNA binding and receptor kinase activity. Other interesting pathways were neutrophil degranulation, amyloid beta binding, angiogenesis, collagen degradation, among other functions.

### Replication Phase

In the table 1 we show the principal characteristics of the replication sample, split by cases and controls ( $n=160$ ). Median age of the sample was 65 (62-68) and 70 (43.8%) were females. Cases showed a higher increase in the systolic blood pressure (SBP) within visits, and higher burden of baseline WMH as compared to controls.

In the replication phase MMP9, MET and ASAH were measured by ELISA, obtaining inter-plate CVs under 15% in all cases. In the supplementary figure 2 we compare the mean biomarker concentration from baseline to follow-up visits. Concretely, MMP9 and

MET significantly decreased within visits, while ASAH2 increased (all  $p$ -values  $<0.001$ ).

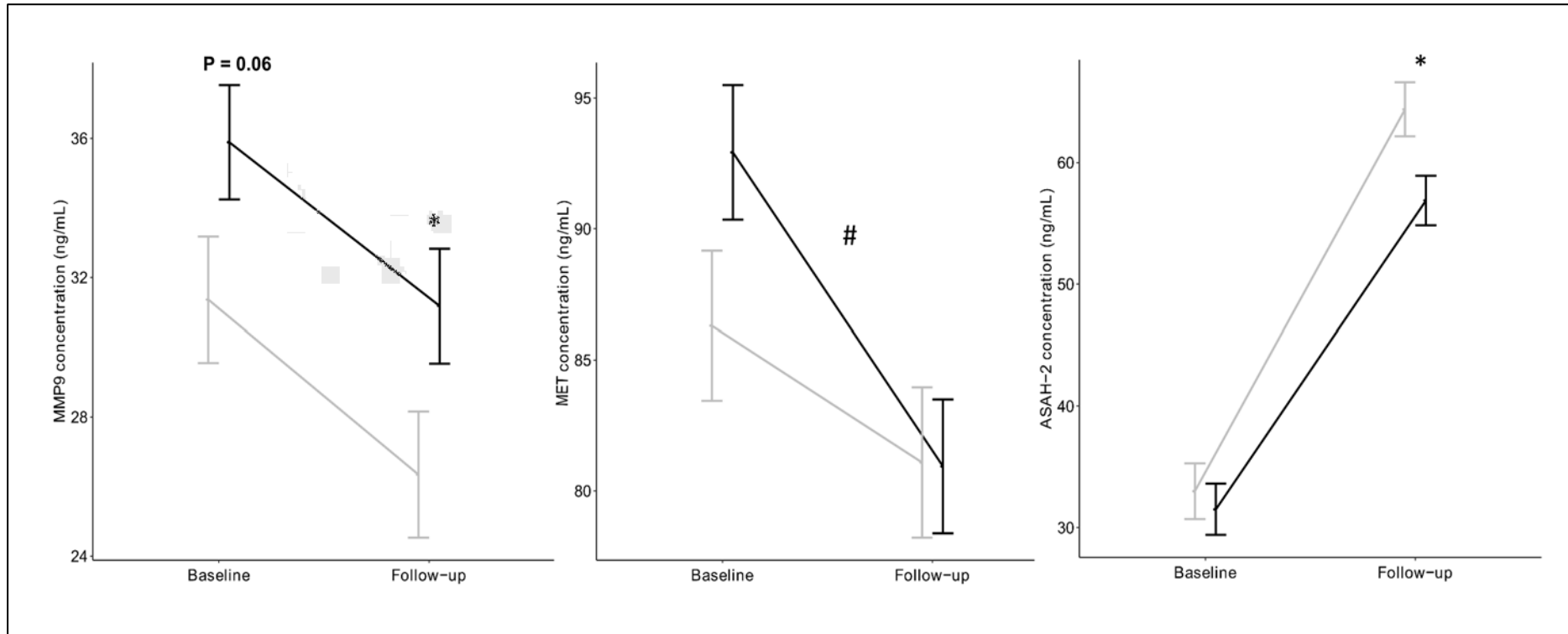
Among subjects from the replication phase, 22 individuals were also present in the discovery study. In this subsample cases presented a higher concentration of baseline MMP9 as compared to controls (mean [standard deviation], 27.34 ng/mL [11.60] and 37.41 [10.78].  $P$ -value=0.048), similar to the discovery analysis. However, results were not validated in the case of MET and ASAH2 as showed in supplementary figure 3. These results suggest that SOMAscan technique is validated by ELISA considering MMP9, while regarding MET and ASAH2 is not.

In figure 3 we present the level of biomarker concentrations from baseline to follow-up by cases and controls. Subjects with progression of WMH did not differ in baseline biomarker concentrations in any of the studied proteins, indicating that no biomarker predicted the progression of WMH in the replication study. We only found a borderline association ( $P$ -value=0.06) regarding baseline MMP9 concentration.

**Table 1. Characteristics of the replication phase sample by cases and controls**

	Controls	Cases	P-value
Baseline Age, years	65 (62;68)	65 (62;67)	0.876
Sex	45 (56.25)	45 (56.25)	1
Time between visits, years	3.95 (3.81;4.14)	3.95 (3.84;4.28)	0.810
<b>Vascular risk factors</b>			
Diabetes mellitus	16 (20)	14 (17.5)	0.840
Active Smoker	8 (10)	10 (12.5)	0.800
SBP, mmHg	144.94 (15.31)	141.06 (18.44)	0.149
<b>ΔSBP, mmHg</b>	<b>1.32 (14.7)</b>	<b>8.43 (19.65)</b>	<b>0.011</b>
DBP, mmHg	78.19 (9.39)	78.17 (9.42)	0.993
ΔDBP, mmHg	-3.69 (8.92)	-1.32 (10.08)	0.120
Cholesterol, mg/dL	216.42 (44.61)	214.34 (43.47)	0.766
ΔCholesterol, mg/dL	-2.14 (40.99)	-8.05 (40.59)	0.362
HDL Cholesterol, mg/dL	46.8 (38.7;58.6)	47.5 (40.5;57.82)	0.644
ΔHDL Cholesterol, mg/dL	3.65 (-0.25;10.28)	3.6 (-1.82;9.47)	0.656
<b>Baseline Cerebral Small Vessel Disease</b>			
<b>Extensive PVH</b>	<b>12 (15)</b>	<b>23 (28.75)</b>	0.06
<b>Extensive DWMH</b>	<b>4 (5)</b>	<b>27 (33.75)</b>	<b>&lt;0.01</b>
Silen brain infarct	12 (15)	22 (27.5)	0.08

**Table 1:** Values represent mean (SD), median (interquartile range) or number (%). Bolded variables are those which show significant differences between cases and controls ( $P$ -value $<0.05$ ). Key: DBP, diastolic blood pressure; DWMH, deep white matter hyperintensities; HDL, high density lipoprotein; PVH, periventricular hyperintensities; SBP, systolic blood pressure.



**Figure 3. Biomarker concentrations of the replication phase (N=160).** Lines represent adjusted means from baseline to the follow-up visit in cases (black) and controls (grey). Error bars represent the standard error of the adjusted mean. These adjusted means have been extracted from mixed models adjusted by: baseline age, sex, visit, change in systolic blood pressure and baseline WMH.

\*→p-value<0.05 between groups at the baseline visit or at the follow-up visit.

#→group and visit interaction p-value<0.05. This interaction term represents the difference in the rate of changes between groups in biomarker concentrations.

However, group and visit interaction was statistically significant for MET, meaning that individuals with progression of WMH presented a steeper decline in MET concentration within visits as compared to controls ( $\beta$  [95%CI], -6.77 [-1.68 to -11.87]. P-value=0.01). On the other hand, compared to controls, cases showed a higher concentration at the follow-up visit for MMP9 (adjusted mean [standard error], 26.34 [1.81] vs 31.18 [1.65], respectively. P-value=0.046) and a lower concentration for ASAH2 (64.83 [2.27] vs 56.83 [2.08], respectively. P-value=0.013).

## DISCUSSION

In this study we screened 1305 proteins from plasma of patients with progression of WMH. Thereby, we selected three biomarker candidates to replicate in a second stage (MMP9, MET, ASAH2) and further studied whether their changes over time were observed in parallel to WMH progression. In this replication phase, no marker predicted the progression of WMH, although MMP9 showed a marginally association. Still, patients with progression of WMH showed a steeper decline in MET concentration within visits, suggesting a protective role of this protein in disease progression. Moreover, patients presenting WMH progression exhibited a higher concentration of MMP9 and a lower concentration of ASAH2 at the follow-up visit.

MET is a tyrosine kinase receptor of the hepatocyte growth factor (HGF), also known as “scatter factor”, which is expressed in many tissues. In brain the HGF/MET activation is considered to be involved in synaptic plasticity, survival, proliferation, angiogenesis, among other processes via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/Protein Kinase B (PI3K/AKT) pathway<sup>27</sup>. Higher serum and cerebrospinal HGF concentrations have been previously associated with WMH burden in several cross sectional studies in Alzheimer’s disease patients and in individuals with subjective memory complaints<sup>28, 29</sup>. We observed that MET decline parallels the increase in WMH over time in patients with hypertension. Interestingly, HGF and MET has been shown to be associated with angiogenesis<sup>30</sup> and better recoveries after ischemic injury<sup>31</sup>. The decrease of MET within visits may be indicating a downregulated activity of angiogenesis and other neurotrophic processes, which may be explained by a lower activity of HGF/MET. Of note, in the pathway analysis angiogenesis was downregulated in cases. Future studies measuring both MET and HGF proteins should confirm these results.

Patients with progression of WMH showed a higher concentration of MMP9 at the follow-up visit. MMP9 is considered to be responsible of collagen IV degradation, leading to blood brain barrier (BBB) disruption<sup>32</sup>. Our results are in line with a previous cross-sectional study reporting a correlation between MMP9 levels and WMH burden<sup>10</sup>. However, in our study differences were only observed at the follow-up visit, indicating that MMP9 levels did not predict the progression of WMH, although this association was borderline significant (P-value=0.06). Future studies should address the relationship between MMP9 and the progression of WMH in larger samples.

On the other hand, patients showing an increase in WMH presented lower ASAH2 levels at the follow-up visit. ASAH2 is involved in sphingolipid metabolism hydrolyzing ceramides, preventing its accumulation<sup>33</sup>. Ceramide accumulation has been shown to be associated with incident cardiovascular disease and cognitive impairment in previous studies<sup>34, 35</sup>. Similarly, deregulations in the sphingolipids metabolism have been described in other neurological pathologies as Alzheimer’s disease<sup>36</sup>. However, to our better knowledge, no study described an association between ASAH2 and the progression of WMH.

Altogether, we presented several proteins and biological processes which relate to WMH changes over time. The association of MET and MMP9 with WMH may be explained by their role in angiogenesis and blood brain barrier permeability, respectively. However, no causal inference is possible considering our results. Further longitudinal studies are needed to improve the knowledge of which causes are behind these associations. Of note, it is important to consider WMH as a complex disease in which several causes may be involved in its pathogenesis. Hence, one biomarker may be not enough to predict the evolution of WMH and to combine several markers information in a panel may be of interest. In this regard, omics techniques in combination with longitudinal studies may help to achieve new diagnostic tools and a better understanding of cSVD pathophysiology.

This study has several strengths and limitations. One limitation is the sample size which limited our statistical power to correct for multiple comparisons in both experiments —discovery and replication stages—. Furthermore we did not analyzed the whole proteome and future research may consider other approaches as mass spectrometry. Similarly, in the replication phase we only considered three

candidates due to budget limitations. However, our study may be considered as hypotheses-generating and propose several mechanisms and proteins implicated in the progression of WMH. On the other hand, in the replication phase we could not pair cases and controls by initial WMH volume. As strengths, we conducted a proteomic discovery study followed by a replication phase, which brings reliability to our results. Progression of WMH was qualitatively defined by a previous cutoff that may be easily exported to future research<sup>37</sup>.

As conclusions, decline in MET serum concentration paralleled the increase in WMH in subjects with hypertension. Moreover, patients with progression of WMH presented higher levels of MMP9 over time, and lower levels regarding ASAH2. Although no marker predicted the change in WMH, these may be interesting proteins to validate in larger general population cohorts.

#### REFERENCES

1. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: From pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet. Neurology*. 2010;9:689-701
2. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: Mechanisms and clinical implications. *The Lancet. Neurology*. 2019
3. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: Insights from neuroimaging. *The Lancet. Neurology*. 2013;12:483-497
4. Prins ND, Scheltens P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: An update. *Nature reviews. Neurology*. 2015;11:157-165
5. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2013;62:810-817
6. Schmidt R, Seiler S, Loitfelder M. Longitudinal change of small-vessel disease-related brain abnormalities. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36:26-39
7. Jimenez-Balado J, Riba-Llena I, Abril O, Garde E, Penalba A, Ostos E, Maisterra O, Montaner J, Noviembre M, Mundet X, Ventura O, Pizarro J, Delgado P. Cognitive impact of cerebral small vessel disease changes in patients with hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2019;73:342-349
8. Silbert LC, Nelson C, Howieson DB, Moore MM, Kaye JA. Impact of white matter hyperintensity volume progression on rate of cognitive and motor decline. *Neurology*. 2008;71:108-113
9. 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. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36:55-71
10. Kim Y, Kim YK, Kim NK, Kim SH, Kim OJ, Oh SH. Circulating matrix metalloproteinase-9 level is associated with cerebral white matter hyperintensities in non-stroke individuals. *European neurology*. 2014;72:234-240
11. 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;977:306-314
12. Rouhl RP, Damoiseaux JG, Lodder J, Theunissen RO, Knottnerus IL, Staals J, Henskens LH, Kroon AA, de Leeuw PW, Tervaert JW, van Oostenbrugge RJ. Vascular inflammation in cerebral small vessel disease. *Neurobiology of aging*. 2012;33:1800-1806
13. Vilar-Bergua A, Riba-Llena I, Ramos N, Mundet X, Espinel E, Lopez-Rueda A, Ostos E, Seron D, Montaner J, Delgado P. Microalbuminuria and the combination of mri markers of cerebral small vessel disease. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2016;42:66-72
14. 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
15. van Dijk EJ, Prins ND, Vermeer SE, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. C-reactive protein and cerebral small-vessel disease: The rotterdam scan study. *Circulation*. 2005;112:900-905
  16. Schilling S, Tzourio C, Dufouil C, Zhu Y, Berr C, Alperovitch A, Crivello F, Mazoyer B, Debette S. Plasma lipids and cerebral small vessel disease. *Neurology*. 2014;83:1844-1852
  17. Nagai M, Hoshida S, Kario K. Association of prothrombotic status with markers of cerebral small vessel disease in elderly hypertensive patients. *American journal of hypertension*. 2012;25:1088-1094
  18. 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 neurology*. 2013;13:130
  19. 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. American journal of roentgenology*. 1987;149:351-356
  20. van Dijk EJ, Prins ND, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Progression of cerebral small vessel disease in relation to risk factors and cognitive consequences: Rotterdam scan study. *Stroke*. 2008;39:2712-2719
  21. Rohloff JC, Gelinas AD, Jarvis TC, Ochsner UA, Schneider DJ, Gold L, Janjic N. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Molecular therapy. Nucleic acids*. 2014;3:e201
  22. Candia J, Cheung F, Kotliarov Y, Fantoni G, Sellers B, Griesman T, Huang J, Stuccio S, Zingone A, Ryan BM. Assessment of variability in the somascan assay. 2017;7:14248
  23. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for rna-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*. 2015;43:e47
  24. Reimand J, Isserlin R. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, gsea, cytoscape and enrichmentmap. 2019;14:482-517
  25. Subramanian A, Kuehn H, Gould J, Tamayo P, Mesirov JP. Gsea-p: A desktop application for gene set enrichment analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007;23:3251-3253
  26. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13:2498-2504
  27. Sharma S. Hepatocyte growth factor in synaptic plasticity and alzheimer's disease. *TheScientificWorldJournal*. 2010;10:457-461
  28. Zhu Y, Hilal S, Chai YL, Ikram MK, Venketasubramanian N, Chen CP, Lai MKP. Serum hepatocyte growth factor is associated with small vessel disease in alzheimer's dementia. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:8
  29. Tsuboi Y, Kakimoto K, Nakajima M, Akatsu H, Yamamoto T, Ogawa K, Ohnishi T, Daikuhara Y, Yamada T. Increased hepatocyte growth factor level in cerebrospinal fluid in alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica*. 2003;107:81-86
  30. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (hgf) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. 2010;86:588-610
  31. Shimamura M, Sato N, Waguri S, Uchiyama Y, Hayashi T, Iida H, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Gene transfer of hepatocyte growth factor gene improves learning and memory in the chronic stage of

- cerebral infarction. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2006;47:742-751
32. Montaner J, Ramiro L, Simats A, Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Bustamante A, Rosell A. Matrix metalloproteinases and adams in stroke. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76:3117-3140
33. Coant N, Sakamoto W, Mao C, Hannun YA. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in biological regulation*. 2017;63:122-131
34. Wang DD, Toledo E, Hruby A, Rosner BA, Willett WC, Sun Q, Razquin C, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Guasch-Ferre M, Corella D, Gomez-Gracia E, Fiol M, Estruch R, Ros E, Lapetra J, Fito M, Aros F, Serra-Majem L, Lee CH, Clish CB, Liang L, Salas-Salvado J, Martinez-Gonzalez MA, Hu FB. Plasma ceramides, mediterranean diet, and incident cardiovascular disease in the predimed trial (prevencion con dieta mediterranea). *Circulation*. 2017;135:2028-2040
35. Chan P, Saleem M, Herrmann N, Mielke MM, Haughey NJ, Oh PI, Kiss A, Lanctot KL. Ceramide accumulation is associated with declining verbal memory in coronary artery disease patients: An observational study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2018;64:1235-1246
36. He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2010;31:398-408
37. Prins ND, van Straaten EC, van Dijk EJ, Simoni M, van Schijndel RA, Vrooman HA, Koudstaal PJ, Scheltens P, Breteler MM, Barkhof F. Measuring progression of cerebral white matter lesions on mri: Visual rating and volumetrics. *Neurology*. 2004;62:1533-1539



**NEW BIOMARKER CANDIDATES IN THE PREDICTION AND MONITORING  
OF WHITE MATTER HYPERINTENSITIES PROGRESSION.**

Joan Jiménez-Balado, Jesús Pizarro, Iolanda Riba-Llena, Anna Penalba, Julia Faura, Elena Palà,  
Joan Montaner, Mar Hernández-Guillamon, Pilar Delgado.

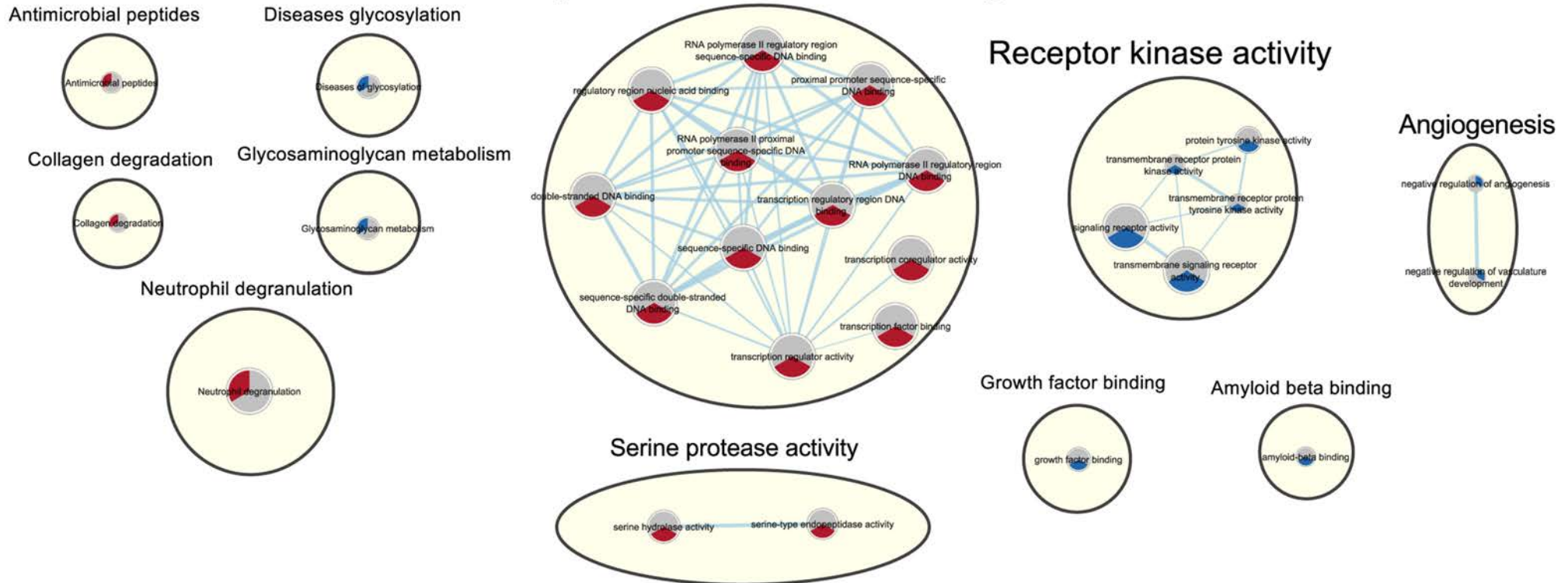
**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

---



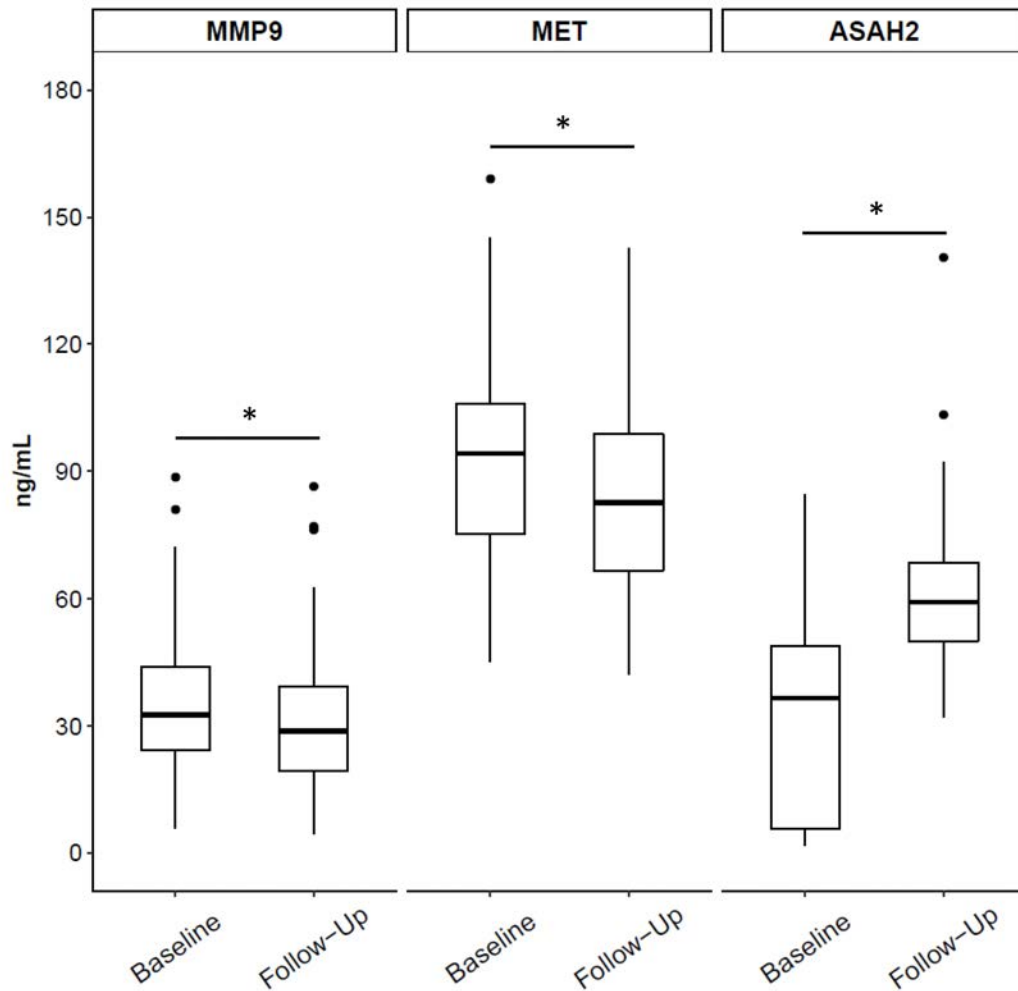


# Specific DNA binding



**Supplementary Figure 1. Enriched pathways in the proteomic data.**

We considered the Reactome and Gene Ontologies pathways (biological processes and molecular function). Red circles indicate upregulated processes in patients with progression of WMH, while blue circles represent downregulated processes. 5 pathways were significantly enriched (at  $q$ -value $<0.25$ ) regarding the Reactome, 21 considering GO molecular function and 2 considering GO biological processes. Annotations have been constructed by means of Cytoscape software and correspond to the most frequent words in the cluster.

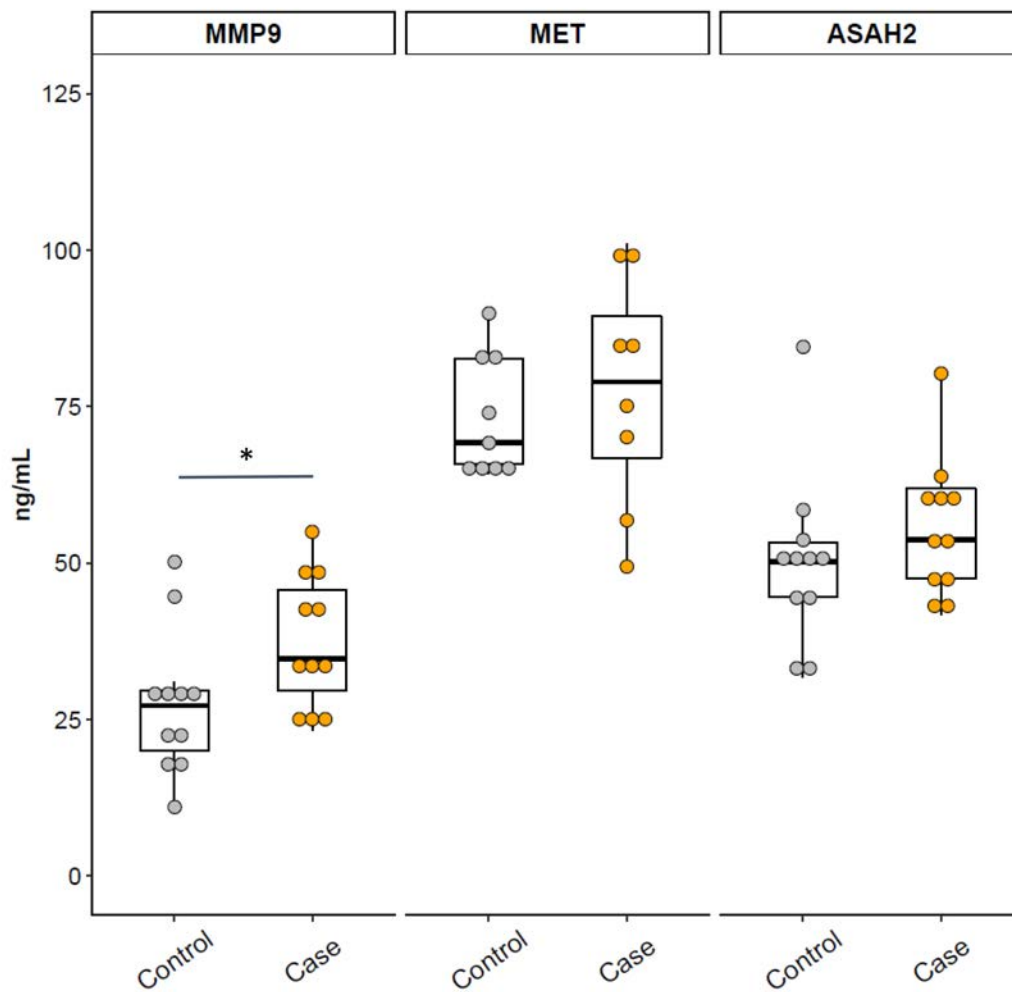


**Supplementary figure 2. Boxplots showing the temporal profile of biomarkers from the replication phase.**

X axis represents the visit (baseline and follow-up), while Y axis represents the concentration for all biomarkers in the replication phase (n=160). Each panel represents one protein (MMP9, MET and ASAH2).

Missing data: 13 samples were missing considering MET (7 were baseline samples and 6 were follow-up samples) and 12 for ASAH2 (all baseline samples).

\*: P-value<0.01. Key: ASAH2, Neutral ceramidase; MET, Hepatocyte growth factor receptor; MMP9, Matrix metalloproteinase-9; RFU, relative fluorescence units.



**Supplementary Figure 3. Boxplots representing baseline biomarker concentrations of the replication phase in subjects who additionally belonged to the discovery study (N=22).**

Y axis represents baseline concentrations in biomarkers tested in the replication phase. X axis represents the group (cases versus controls). Each panel represents one protein (MMP9, MET and ASAH2). Results can be compared with those of figure 2-B.

Missing data: 3 out of 11 pairs missed baseline MET concentration in the replication phase.

\*: P-value<0.05.







**Silent Brain Infarcts, Peripheral Vascular Disease And The Risk Of  
Cardiovascular Events In Patients With Hypertension**

(Jiménez-Balado J, et al. Manuscript under revision)

---





# SILENT BRAIN INFARCTS, PERIPHERAL VASCULAR DISEASE AND THE RISK OF CARDIOVASCULAR EVENTS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION

Jimenez-Balado J<sup>\*a</sup>, Riba-Llena I<sup>\*a</sup>, Nafría C<sup>a</sup>, Sánchez-Ballesteros S<sup>c</sup>, Pizarro J<sup>a</sup>, Mundet X<sup>c</sup>, Violan C<sup>c</sup>, Montaner J<sup>a</sup>, Delgado P<sup>a,b</sup>

- a) Neurovascular Research Lab. Vall Hebron Research Institute. Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona, Spain.
- b) Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona. Dementia Unit, Neurology Service. Barcelona, Spain.
- c) Primary Healthcare University Research Institute IDIAP Jordi Gol. Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona, Spain.

**Corresponding Author:** Dr. Pilar Delgado Martínez. Institut de Recerca Vall d'Hebron, Edifici Mediterrània, Planta 1<sup>a</sup>, Laboratori 123, Passeig Vall d'Hebron 119-129, CP 08035, Barcelona. 93/489 40 29. [pilar.delgado@vhir.org](mailto:pilar.delgado@vhir.org)

\*Jiménez-Balado J and Riba-Llena I contributed equally in the production of this manuscript.

---

## ABSTRACT

**Aim:** We aimed to study the relationship between cerebral small vessel disease (cSVD) lesions, as markers of subclinical target organ damage (TOD) in the brain, and incident cardiovascular events (CVE).

**Methods:** Data from the ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives Study), which is a longitudinal and observational study conducted in patients with hypertension aged 50-70, and dementia and stroke-free at the inclusion.

At the baseline visit subjects underwent a clinical interview, a brain MRI, urine and blood sampling collection and vascular testing studies. Therefore, we obtained markers of TOD from the brain (white matter hyperintensities, silent brain infarcts [SBI], cerebral microbleeds and enlarged perivascular spaces [EPVS]), from the kidney (microalbuminuria, glomerular filtration rate) and regarding large vessels (ankle to brachial index [ABI], carotid-femoral pulse wave velocity).

Survival analyses were used in order to assess the relationship between these predictors and the incidence of cardiovascular events (CVE).

**Results:** We followed-up 964 individuals within a median time of 5 years (4.7-5), accounting for 4377.1 persons-year. We found, 73 patients presenting a new CVE, which corresponds to a rate of 8.2%.

We found ABI<0.9 (HR=2.20, P-value=0.014) and SBI (HR=2.87. P-value=0.002) independently associated with higher hazards of incident CVE. The inclusion of both variables in a clinical model resulted in an increased discrimination of individuals with new CVE of 4.72%, according to the integrated discrimination index.

**Conclusions:** Assessment of SBI and ABI<0.9 may refine the cardiovascular risk stratification in patients with hypertension.

---

## INTRODUCTION

Cardiovascular and cerebrovascular diseases (CVD) are the first and the third cause of death in Spain<sup>1</sup>, and one of the most important causes of disability<sup>2, 3</sup>. Affecting between 55 to 75% of older adults ( $\geq 65$  years), hypertension is considered the major risk factor of CVD<sup>2, 4, 5</sup>. However, this relationship is modified by the presence of other concomitant vascular risk factors (VRF) and the effect of them on target organ damage (TOD). Current clinical guidelines recommend to evaluate markers of subclinical TOD in order to stratify the risk of CVD in patients with hypertension<sup>6</sup>. Most common screened markers of subclinical TOD are albuminuria, kidney function, left ventricular hypertrophy, presence of peripheral artery disease, among others<sup>6</sup>.

Besides them, brain is one of the principal target organ of hypertension, and cerebral small vessel disease (cSVD) is the principal manifestation<sup>7</sup> of TOD. With high prevalence in patients with hypertension<sup>8</sup>, radiological markers of cSVD increase the risk of stroke. Specifically, silent brain infarcts (SBI) and white matter hyperintensities (WMH) are known to double and triplicate the risk of incident stroke, respectively<sup>9, 10</sup>. Other markers of cSVD —as cerebral microbleeds (CMB) or enlarged perivascular spaces (EPVS) — have been less frequently studied regarding this topic. Moreover, cSVD is the cause of up to 20 to 25% of clinical strokes<sup>11</sup>.

However, most studies addressing the relationship between cSVD lesions and CVD did not evaluate or considered other markers of subclinical TOD<sup>12, 13</sup>. Moreover, although we know that SBI and WMH increase the risk of stroke, it is less clear whether they are associated with other types of cardiovascular events (CVE) —as acute myocardial infarction (AMI), angina pectoris, among others—<sup>14</sup>. This question is especially relevant considering the management of patients with subclinical cerebrovascular lesions, which are considered a source of prognostic and therapeutic uncertainty<sup>15</sup>.

Therefore, firstly we aimed to study the association of radiological markers of cSVD, together with other markers of subclinical TOD, with incident CVE in a cohort of patients with hypertension. In a second phase we studied which markers of TOD are the best predictors of new CVE, and the usefulness of their assessment and inclusion in a clinical model.

## METHODS

### Participants and Setting

We conducted this study in the ISSYS (Investigating Strokes in hYpertensives Study) cohort. The full protocol

and design of the ISSYS study have been previously described<sup>16, 17</sup>. Briefly, at the baseline visit (2010-2012) we recruited from 14 primary health care centers in Barcelona a cohort of 976 patients with hypertension. Principal inclusion criteria were: (1) age between 50 to 70 years; (2) essential hypertension diagnosed at least 1 year earlier; (3) no history of dementia or stroke; (4) without contraindications to undergo a brain magnetic resonance imaging (MRI). Subjects underwent a MRI, a cognitive evaluation, a blood and urine sampling collection, a physical examination, a vascular risk assessment and vascular testing studies, including ankle-brachial index and pulse wave velocity assessments.

From 2012 to 2019 we conducted annual telephonic interviews to the whole cohort. In this telephonic interview we principally updated VRF information, the incidence of cardiovascular events, changes in pharmacological treatment and the adherence to blood pressure lowering drugs (BPLD)<sup>16</sup>.

For this study we used data from 964 subjects who underwent the baseline MRI and had at least one follow-up visit (telephonic or face to face) from the beginning of the study to January 2019. In figure 1 we present the study flow-chart.

This study was approved by our local ethics committee and it was in accordance to Helsinki's declaration. Written informed consent was collected prior to inclusion.

### Vascular Risk Factors

Demographic and VRF variables were collected at the baseline visit. Office systolic and diastolic blood pressure (DBP) were calculated as the mean of last two out of three measurements after 5 minutes of rest. Poor SBP and DBP controls were defined as a mean blood pressure higher than 140 and 90 mmHg, respectively.

Cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were measured by an automated clinical chemistry analyzer (Olympus AU 2007). Dyslipidemia was defined as a total cholesterol higher than 240 g/dL or use of lipid-lowering agents. HDL-cholesterol was categorized via quartile distribution.

Diabetes mellitus (DM) was defined as the presence of fasting glucose levels  $>7$  mmol/L or the use of antidiabetic drugs or insulin. Smoking habit was categorized as past or active smoker. Waist circumference was measured in cm and it was categorized according to quartile distribution.

BPLD compliance was assessed via the Morinsky-Green Scale. This scale evaluates the adherence to BPLD in patients with hypertension under pharmacological

treatment with hypotensor drugs. A score equal or higher than 1 was considered as a poor adherence to BPLD. Previous CVD was defined as the presence of prior AMI,

angina pectoris or peripheral artery disease. Finally, we collected history of previous atrial fibrillation according to clinical records.

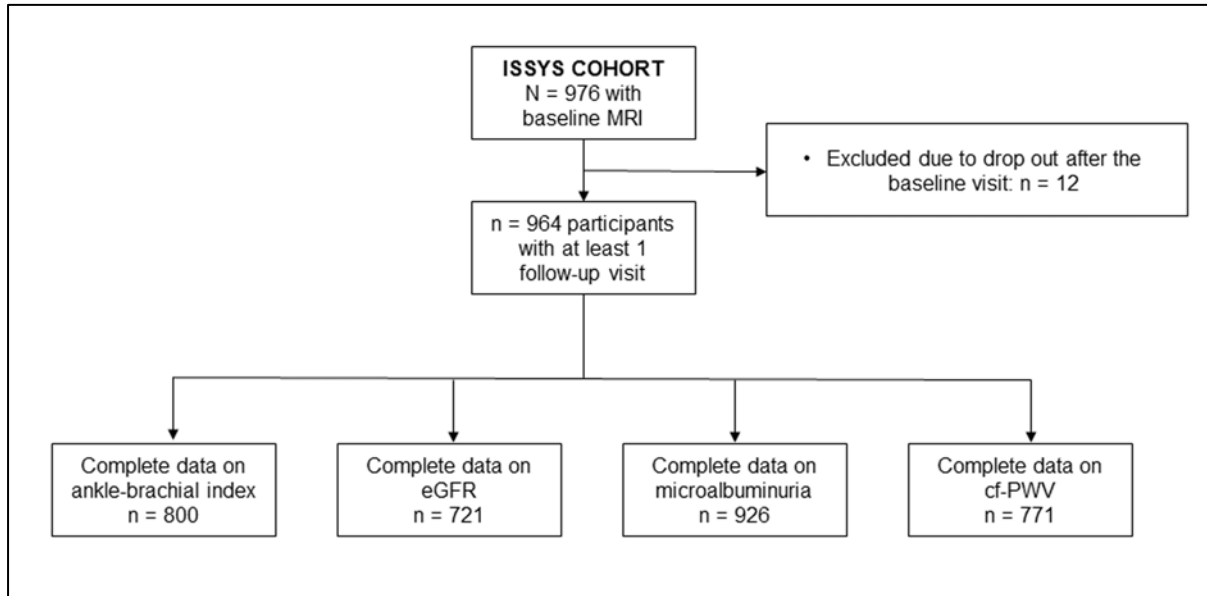


Figure 1: Study flow-chart

Keys: cf-PWV, carotid-femoral pulse wave velocity; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

#### Markers of subclinical Target Organ Damage

Markers of subclinical TOD were evaluated at the baseline visit.

- **Brain**

Patients underwent a 1.5 Tesla MRI at the baseline visit. The MRI protocol included axial T1, T2, fluid attenuation inversion recovery (FLAIR), gradient recalled echo-weighted images (GRE), and sagittal T1-weighted image. Our full MRI protocol has been previously described in detail<sup>16</sup>.

MRI markers of cSVD were rated according to STRIVE criteria<sup>18</sup>. Briefly, Presence of SBI was considered as at least 1 lesion  $\geq 3$  mm in their widest diameter, and presenting a cerebrospinal fluid intensity in all MRI sequences, with a hyperintense rim in FLAIR-weighted images. WMH were graded at deep and periventricular locations according to Fazekas' scale in FLAIR-weighted images<sup>19</sup>. For this study we defined extensive WMH at deep or periventricular location as a Fazekas' score  $\geq 2$ . Presence of CMB were assessed in GRE-weighted sequences. Finally, EPVS were rated at the centrum semiovale (CSO) and basal ganglia (BG) in T2-weighted images according to Potter's Scale. We defined extensive EPVS at the CSO or BG as a count  $\geq 10$  according to this scale<sup>20</sup>.

- **Large Vessels**

Ankle-brachial index (ABI) and carotid-femoral pulse wave velocity (cf-PWV) were assessed by means of Vicorder™ device (Skidmore Medical Ltd, Bristol, UK)<sup>16</sup>. ABI was calculated as the ratio between systolic blood pressure (SBP) of each ankle and SBP of both upper limbs. SBP in this case was measured by photoplethysmography. The lowest of both ABIs was used and it was considered as altered when it was  $< 0.9$ , according to current American Heart Association guidelines<sup>21</sup>.

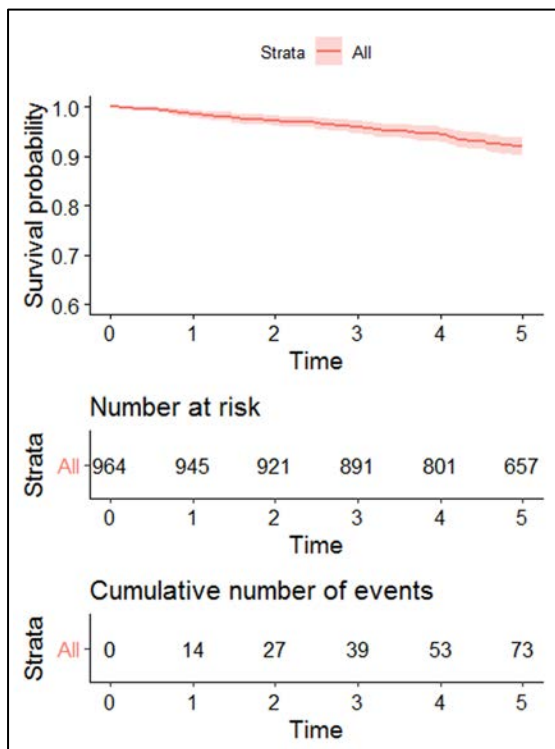
On the other hand, cf-PWV was assessed in supine position and after 10 minutes rest with the Vicorder® oscillometric device (SMT Medical, Würzburg, Germany). The full protocol for the calculation of cf-PWV has been previously described<sup>16, 22</sup>. Briefly, we placed two inflatable cuffs, one at the carotid site and one larger at the femoral site. Then we measured with a tape the distance between external notch and the femoral cuff, and this was considered the path distance. The two cuffs were subsequently inflated to 60 mmHg, and then they were deflated in order to obtain the pressure tracing. Cf-PWV is calculated by the Vicorder by comparing carotid and femoral pressure tracings after a stable pattern is obtained. Finally, to compute cf-PWV (m/s) the device used the ratio between path distance and pulse wave transit time with an in-built cross-correlation algorithm.

- **Kidney**

Serum creatinine levels were obtained after overnight-fasting conditions in all patients. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated according to Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula<sup>23</sup>. Chronic kidney disease was defined as an eGFR < 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Urine albumin-creatinine ratio was measured from a single spot urine collected at the baseline visit and sent to the central laboratories. Microalbuminuria (MAU) was defined according to previously described cutoffs —defined as an UACR > 21mg/g in men and 30 mg/g in women—<sup>24</sup>.

**Cardiovascular events**

Incident CVEs were defined as the presence of new AMI, stroke, transient ischemic attack, congestive heart failure, angina pectoris, intermittent claudication, peripheral artery disease and vascular death. All cardiovascular events required hospitalization of at least 24h. When a possible CVE was detected in a follow-up interview, we reviewed the computerized clinical records to confirm the findings and we collected the clinical information.



**Figure 2: Survival Curve in the Sample.**

**Table 1: Principal Characteristics of the sample (N=964)**

Demographic Information	
Age, years	64 (59;67)
Sex, female	488 (50.6)
Baseline Vascular Risk Factors	
Mean Office SBP, mmHg	141.5 (132;153)
Poor SBP control, n <sup>o</sup> (%)	520 (54.2)
Mean Office DBP, mmHg	77.5 (9.5)
Poor DBP control, n <sup>o</sup> (%)	89 (9.3)
Hypertension duration, years	8.6 (5.3;12.4)
Poor BPLD compliance, n <sup>o</sup> (%)	499 (54.2)
Total Cholesterol, mg/dL	218 (188;244)
HDL Cholesterol, mg/dL	47.5 (40.1;57)
Diabetes Mellitus, n <sup>o</sup> (%)	229 (23.8)
Waist Circumference, cm	101 (94.8;109)
Previous Ischemic Cardiopathy, n <sup>o</sup> (%)	92 (9.6)
Active Smoker, n <sup>o</sup> (%)	145 (15.1)
Markers of Target Organ Damage	
Silent Brain Infarcts, n <sup>o</sup> (%)	97 (10.1)
Extensive PVH, n <sup>o</sup> (%)	92 (9.6)
Extensive DWMH, n <sup>o</sup> (%)	46 (4.8)
Cerebral Microbleeds, n <sup>o</sup> (%)	64 (6.7)
Extensive BG-EPVS, n <sup>o</sup> (%)	230 (24.1)
Extensive CSO-EPVS, n <sup>o</sup> (%)	379 (39.8)
ABI < 0.9, n <sup>o</sup> (%)	79 (9.9)
cf-PWV (m/s)	10.5 (9.2;11.9)
eGFR < 60mL/min/1.73m <sup>2</sup> , n <sup>o</sup> (%)	49 (6.8)
Microalbuminuria, n <sup>o</sup> (%)	113 (12.2)

Principal Characteristics of the sample. Numbers represent mean (standard deviation), median (interquartile range) or number (percentage).

Key: ABI, ankle brachial index; BPLD, blood pressure lowering drugs; cf-PWV, carotid-femoral pulse wave velocity; DBP, diastolic blood pressure; DWMH, deep white matter hyperintensities; eGFR, estimated glomerular filtration rate; EPVS, enlarged perivascular spaces; HDL, high density lipoprotein; PVH, periventricular white matter hyperintensities; SBP, systolic blood pressure.

## Statistics

All analyses were conducted using R software (R version 3.6, 2019-04-30; © 2019 The R Foundation for Statistical Computing).

Descriptive analysis was conducted in the whole sample of individuals with baseline MRI (N = 964). Data was represented as mean (standard deviation), median (interquartile range) or number (percentage) according to the type and distribution of each variable.

Longitudinal survival data was obtained until January 2019. However, in order to reduce the number of drop-outs during the follow-up, we censored survival data at the 5<sup>th</sup> year of follow-up.

First we conducted univariate analyses in order to find which VRF and markers of TOD were associated with higher rates of CVEs. For that objective, we conducted Kaplan-Meier curves for each predictor variable of interest. Differences between groups in survival functions were tested by means of log-rank test. Incidence rates are reported as 1 minus survival function and 95% confidence interval. Regarding markers of TOD, we corrected results for multiple testing via false discovery rate (FDR) according to Benjamini & Hochberg procedure.

Then, in order to build a clinical model, those VRF and confounding variables showing a P-value < 0.1 in the univariate analysis or which have been previously described to be associated with CVD, were introduced in a Cox proportional hazards model. Therefore, we introduced in the model age, sex, poor DBP control, DM, smoking habit, previous coronary artery disease, cholesterol, HDL-cholesterol and waist circumference. We subsequently selected the most important clinical variables via a backward stepwise elimination by AIC criteria (R package “stats”). Secondly, we constructed a new model introducing those markers of TOD which were associated with CVE in the univariate analysis, and adjusting by the previously fitted clinical model. This second model was also simplified following the same stepwise criteria as in the clinical model. Both models, clinical and clinical + TOD, were compared by means of likelihood ratio test. Proportional hazards assumptions of both models were tested by plotting Schoenfeld residuals against time.

As we studied the relationship between markers of cSVD and CVE of any type, we conducted a sensitivity analysis excluding patients with incident stroke (N=21). Furthermore, an additional sensitivity analysis was conducted in the subgroup of subjects without previous coronary artery disease (N=870).

We subsequently assessed and compared the performance of the clinical and clinical + TOD models. Discrimination was determined by means of ROC curves. P-values representing the differences in the area under the ROC curve in both models were calculated by Wald tests based on standard errors obtained with an estimate of the influence function (“riskRegression” library<sup>25-27</sup>). Discrimination analysis was completed by means of the integrated discrimination index (IDI)<sup>28</sup>. Finally, calibration of each model was visualized by plotting the observed probabilities of event in the sample against the predicted probabilities of both models. We subsequently compared the calibration by means of Brier score.

## RESULTS

### Follow-up

Principal characteristics of the sample are shown in the table 1. Median age of the sample was 64 years (59-67) and 50.6% were females.

We followed-up 964 individuals for a median time of 5 years (4.7-5), representing 4377.1 persons-year. Moreover, most subjects underwent at least three follow-up visits (94.4%). During the course of the study, 73 patients presented a new CVE and this corresponds to a rate of 8.2% (95% CI = 6.3 to 9.9). Among these incident events, 58.8% were major events (stroke or AMI). Survival function is displayed in figure 2. At the end of the follow-up we observed a 24.3% of censored cases and 30 individuals died from other causes —most of them cancer—.

### VRF, Markers of subclinical TOD and risk of new CVE

In supplementary table 1 we represent the relationship between the principal VRF and the rate of new CVE. Specifically, male sex, presence of DM, smoking habit, poor DBP control, low HDL-cholesterol and previous CVD were associated with a higher incidence of new CVE (all P-values < 0.05).

Among MRI markers of cSVD, presence of SBI, extensive PVH and extensive BG-EPVS were associated with an increased rate of incident CVE (table 2). Regarding other markers of subclinical TOD, MAU and ABI<0.9 related to a lower survival rate (table 2). After correct for multiple comparisons all results remained.

We subsequently constructed a multivariate cox clinical model adjusting by sex, age, poor DBP control, DM, smoking habit, previous ischemic cardiopathy, total cholesterol, HDL-cholesterol and waist circumference. Among these clinical variables, sex, age, DM, previous ischemic cardiopathy, smoking habit, and DBP control

remained in the model after the backward stepwise elimination (table 3).

When we included in the clinical model those markers of TOD associated with CVE in the univariate analysis —SBI, PVH, BG-EPVS, ABI<0.9 and MAU—, SBI and ABI<0.9 remained in the final model (table 3). Concretely, presence of SBI and ABI<0.9 were associated with a 2.87 (CI 95% = 1.47 to 5.58. P-value = 0.002) and 2.20 (CI95% = 1.17 to 4.13. P-value = 0.014) increased hazard of incident CVE.

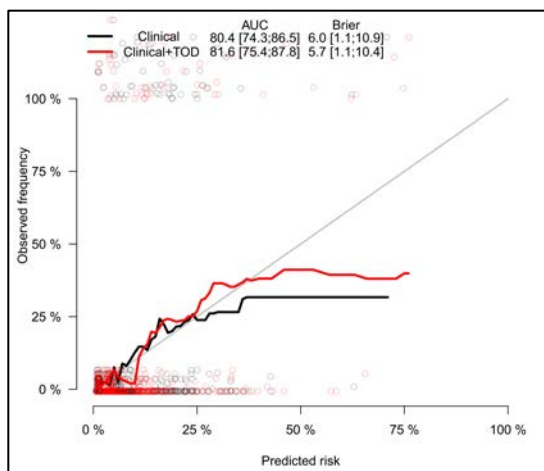
After excluding patients with stroke or previous ischemic cardiopathy in sensitivity analyses (supplementary tables 2 and 3, respectively), SBI and ABI<0.9 were consistently the most associated markers of subclinical TOD in the prediction of CVE. However, variables that remained in the clinical model slightly varied as compared to the whole sample.

### Model Performance

Inclusion of SBI and ABI<0.9 in a clinical model resulted in a significant improvement of the model fitting according to the likelihood ratio test (P-value < 0.001).

Discrimination was evaluated by ROC curves and IDI. According to ROC analysis, clinical and clinical + TOD models presented an AUC of 0.80 and 0.82, respectively (figure 3, P-values = 0.319). By contrast, according to IDI, there was a significant improvement of discrimination of 4.72% (95% CI = 1.19 to 8.24. Increase in events = 4.54. Increase in non-events = 0.18. P-value = 0.009).

Calibration is represented in figure 3, observing no significant differences between both models according to the brier score (P-value = 0.586).



**Figure 3:** Calibration plots at the 5<sup>th</sup> year of follow-up. Y-axis represent the observed probability of CVE in the sample, while X-axis displays the predictions of clinical (black) and clinical+TOD (red) cox regression models.

**Table 2:** Relationship between markers of TOD and risk of incident CVD at 5th year

Marker of TOD	5-year risk of CVD, % (95% CI)	Q-value
<b>Presence of SBI</b>		
No	6.9 (5.1;8.7)	
Yes	19.9 (11.7;28.1)	<0.001
<b>Extensive PVH</b>		
No	7.4 (5.6;9.2)	
Yes	15.8 (7.8;23.8)	0.028
<b>Extensive DWMH</b>		
No	8.1 (6.3;9.9)	
Yes	10.6 (0.6;20.6)	0.783
<b>Presence of CMB</b>		
No	8.1 (6.3;9.9)	
Yes	10.3 (2.5;18.1)	0.707
<b>Extensive BG-EPVS</b>		
No	6.6 (4.6;8.6)	
Yes	12.8 (8.3;17.3)	0.012
<b>Extensive CSO-EPVS</b>		
No	7.3 (5.1;9.5)	
Yes	9.7 (6.6;12.8)	0.405
<b>ABI &lt; 0.9</b>		
No	5.7 (3.9;7.5)	
Yes	22.2 (12.6;31.8)	<0.001
<b>cf-PWV</b>		
1st Quartile	6.3 (2.6;10)	
2nd Quartile	7.6 (3.7;11.5)	
3rd Quartile	7.9 (4;11.8)	
4th Quartile	10.1 (5.6;14.6)	0.707
<b>Microalbuminuria</b>		
No	7.2 (5.4;9)	
Yes	15 (8.1;21.9)	0.012
<b>EGFR &lt; 60</b>		
No	8.7 (6.5;10.9)	
Yes	6.2 (-0.5;12.9)	0.707

Values represent the differences in rate of cardiovascular events (1 minus survival at 5<sup>th</sup> year according to Kaplan-Meier estimator) by markers of target organ damage. P-values have been calculated according to log-rank test. Post-hoc multiple testing correction has been applied via FDR.

Key: ABI, ankle brachial index; cf-PWV, carotid-femoral pulse wave velocity; BG, basal ganglia; CMB, cerebral microbleeds; CSO, centrum semioval; DWMH, deep white matter hyperintensities; eGFR, estimated glomerular filtration rate; EPVS, enlarged perivascular spaces; PVH, periventricular white matter hyperintensities; SBI, silent brain infarcts.

**Table 3: Cox regression models combining VRF and TOD information**

Variables	HR (95% CI)	P-value
<b>Clinical Model</b>		
Diabetes Mellitus	2.24 (1.40; 3.60)	<0.001
Sex, male	2.11(1.20; 3.69)	0.009
Previous Ischaemic Cardiopathy	3.23 (1.90; 5.51)	<0.001
Active Smoker	3.75 (2.25; 6.24)	<0.001
Age, per year	1.03 (0.99; 1.08)	0.15
Poor DBP control	1.9 (1.02; 3.57)	0.04
<b>Clinical Model+TOD</b>		
Silent Brain Infarcts	2.87 (1.47; 5.58)	0.002
ABI <0.9	2.2 (1.17; 4.13)	0.014

Values represent hazard ratios and 95% confidence intervals.

Clinical model included sex, age, poor diastolic blood pressure control, diabetes mellitus, smoking habit, previous ischemic cardiopathy, cholesterol, HDL-cholesterol and waist circumference. Clinical+TOD model additionally included those markers of TOD associated with cardiovascular events in the univariate analysis —silent brain infarcts, periventricular hyperintensities, basal ganglia enlarged perivascular spaces, ankle brachial index<0.9 and microalbuminuria—. Variables were selected by backward stepwise elimination.

## DISCUSSION

In this article we studied the usefulness of radiological lesions of cSVD and other markers of subclinical TOD in the prediction of CVE within 5 years. During this time 73 individuals presented a new CVE, which corresponds to a rate of 8.2%. We observed that presence of SBI, PVH, ABI<0.9 and MAU were associated with an increased rate of CVE. When these markers were included in a clinical model adjusting by VRF, we observed that SBI and ABI<0.9 were the most relevant markers of subclinical TOD in the prediction of incident CVE. Specifically SBI and ABI<0.9 were associated with a 2.9 and 2.2-fold increased hazard of CVE. Furthermore, the inclusion of SBI and ABI in a clinical model resulted in a slight, but significant, improvement of discrimination of patients with incident CVE according to IDI (4.72%). By contrast, calibration was equal between models, indicating similar precisions.

SBI are one of the principal hallmarks of cSVD and they are frequent incidental findings on MRI. Previous studies reported a prevalence of SBI between 5 and 10% in population older than 50 years<sup>8, 29</sup>, and the annual incidence rate is estimated in 2-3%<sup>30</sup>. Here we observed that SBI predict the risk of CVE of any type, independently of VRF and other markers of subclinical TOD. Moreover, when we excluded incident strokes in a sensitivity analysis, the relationship between SBI and CVE remained. Other well-known consequences of SBI are cognitive impairment or an increased risk of dementia<sup>31</sup>. Nowadays recommendations in management of patients with SBI

are the control of VRF and to take care of clinical history to determine whether a SBI was not listened or not reported, rather than silent<sup>32-34</sup>. However, it is not known whether this setting may benefit of secondary prevention strategies as compared to current management. A recent small randomized clinical trial testing the efficacy of Aspirin versus Placebo in subjects aged  $\geq 45$  with at least 1 SBI reported a reduction in incident cerebrovascular events, although without finding statistically significant differences<sup>35</sup>. Another small clinical trial in Japanese diabetic patients reported a reduction of SBI incidence by means of antithrombotic drugs administration<sup>36</sup>. However, clinical trials assessing the benefits of secondary prevention in individuals with SBI are scarcer in the current literature, and further research may be of greater interest in order to clarify the therapeutic management of these patients<sup>15, 37, 38</sup>.

Among other markers of subclinical TOD, ABI < 0.9 showed the most significant association with new CVE. Previous research reported significant improvements in the prediction of incident CVD by means of the addition of ABI index in a clinical model<sup>39, 40</sup>. However, it is also relevant to highlight that the inclusion of ABI and SBI in a clinical model just resulted in a slight increase of its predictions. Assessment of markers of TOD should be prioritized according to availability, predictive value and cost-effectiveness criteria. ABI is a simple and non-invasive technique to detect peripheral artery disease. By contrast, SBI may be reflecting TOD in the brain and they are detected via brain MRI or CT-scan, which has a higher



economic cost. Of note, in our cohort only 13 individuals presented concomitant SBI and pathological ABI. Cost-effectiveness studies are needed in order to assess whether the assessment of these markers are feasible in routine clinical practice.

In our population we also found an increased rate of CVE in subjects with extensive PVH and BG-EPVS, although these lesions were not significant when we considered other markers of subclinical TOD. A previous study reported a 3-fold increased risk of AMI and ischemic stroke in individuals with PVH, while this association was weaker in the case of DWMH<sup>41</sup>. Similarly, BG-EPVS were associated with incident CVE while this was not observed in the case of CSO-EPVS. Previous research also reported differences in VRF and consequences of BG and CSO-EPVS<sup>22, 42</sup>.

This study has several strengths and limitations. As limitations we had to censor survival data at the 5<sup>th</sup> year due to drop outs. This limited the number of CVE in our cohort and, thus, our statistical power. Further longer follow-ups should be necessary to confirm our results. Moreover, our study lacked other common markers of TOD as the left ventricular hypertrophy or intima media thickness. As strengths we could highlight the longitudinal design of our study, in which most patients had at least 3 follow-up visits and the confirmation of all clinical events by trained researchers. Another strength is that this study has been conducted in a cohort of well-controlled patients with hypertension. Given the high prevalence of SBI, this study reports interesting results regarding the importance of this marker in the prognosis and risk refinement of patients with hypertension.

## CONCLUSIONS

SBI and ABI<0.9 were associated with a 2.9 and 2.2-fold increased risk of new CVE, respectively. The inclusion of these variables in a clinical model resulted in a slight but significant improvement of discrimination of patients who developed CVE within 5 years of follow-up.

## REFERENCES

1. Soriano JB, Rojas-Rueda D, Alonso J, et al. The burden of disease in Spain: Results from the Global Burden of Disease 2016. *Medicina clinica* 2018;151:171-190.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131:e29-e322.
3. Vega T, Zurriaga O, Ramos JM, et al. Stroke in Spain: epidemiologic incidence and patterns; a health sentinel network study. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 2009;18:11-16.
4. Menendez E, Delgado E, Fernandez-Vega F, et al. Prevalence, Diagnosis, Treatment, and Control of Hypertension in Spain. Results of the Di@bet.es Study. *Revista espanola de cardiologia (English ed)* 2016;69:572-578.
5. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2018;138:e426-e483.
6. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC 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). *European heart journal* 2013;34:2159-2219.
7. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2013;62:810-817.
8. Delgado P, Riba-Llena I, Tovar JL, et al. Prevalence and associated factors of silent brain infarcts in a Mediterranean cohort of hypertensives. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2014;64:658-663.
9. DeBette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)* 2010;341:c3666.
10. Gupta A, Giambone AE, Gialdini G, et al. Silent Brain Infarction and Risk of Future Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* 2016;47:719-725.
11. Arboix A, Marti-Vilalta JL. Lacunar stroke. *Expert review of neurotherapeutics* 2009;9:179-196.
12. Gioia LC, Tollard É, Dubuc V, et al. Silent ischemic lesions in young adults with first stroke are associated with recurrent stroke. *Neurology* 2012;79:1208-1214.
13. Di Tullio MR, Jin Z, Russo C, et al. Patent foramen ovale, subclinical cerebrovascular disease, and ischemic stroke in a population-based cohort. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:35-41.

14. Silent brain infarction in nonrheumatic atrial fibrillation. EAFT Study Group. *European Atrial Fibrillation Trial. Neurology* 1996;46:159-165.
15. Leung LY, Han PKJ, Lundquist C, Weinstein G, Thaler DE, Kent DM. Clinicians' perspectives on incidentally discovered silent brain infarcts - A qualitative study. *PLoS one* 2018;13:e0194971.
16. Riba-Llena I, Jarca CI, Mundet X, et al. Investigating silent strokes in hypertensives: a magnetic resonance imaging study (ISSYS): rationale and protocol design. *BMC neurology* 2013;13:130.
17. Riba I, Jarca CI, Mundet X, et al. Cognitive assessment protocol design in the ISSYS (Investigating Silent Strokes in hYpertensives: a magnetic resonance imaging Study). *Journal of the neurological sciences* 2012;322:79-81.
18. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *The Lancet Neurology* 2013;12:822-838.
19. 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 American journal of roentgenology* 1987;149:351-356.
20. Potter GM, Chappell FM, Morris Z, Wardlaw JM. Cerebral perivascular spaces visible on magnetic resonance imaging: development of a qualitative rating scale and its observer reliability. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 2015;39:224-231.
21. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 2019;74:1376-1414.
22. Riba-Llena I, Jimenez-Balado J, Castane X, et al. Arterial Stiffness Is Associated With Basal Ganglia Enlarged Perivascular Spaces and Cerebral Small Vessel Disease Load. *Stroke* 2018;49:1279-1281.
23. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine* 2009;150:604-612.
24. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 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). *European heart journal* 2007;28:1462-1536.
25. Blanche P, Dartigues J-F, Jacqmin-Gadda H. Estimating and comparing time-dependent areas under receiver operating characteristic curves for censored event times with competing risks. *Statistics in medicine* 2013;32:5381-5397.
26. Brice Ozenne, Anne Lyngholm Sørensen, Thomas Scheike, Christian Torp-Pedersen, Gerd TA. riskRegression: Predicting the Risk of an Event using Cox Regression Models. *The R Journal* 2017;9.
27. Zhang Z, Cortese G, Combescure C, et al. Overview of model validation for survival regression model with competing risks using melanoma study data. *Annals of translational medicine* 2018;6:325.
28. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statistics in medicine* 2008;27:157-172; discussion 207-112.
29. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, et al. Incidental findings on brain MRI in the general population. *The New England journal of medicine* 2007;357:1821-1828.
30. Vermeer SE, Longstreth WT, Jr., Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *The Lancet Neurology* 2007;6:611-619.
31. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *The New England journal of medicine* 2003;348:1215-1222.
32. Saini M, Ikram K, Hilal S, Qiu A, Venketasubramanian N, Chen C. Silent stroke: not listened to rather than silent. *Stroke* 2012;43:3102-3104.
33. Riba-Llena I, Montaner J, Delgado P. Letter by Riba-Llena et al regarding article, "Not listened or not reported rather than silent stroke". *Stroke* 2013;44:e42.
34. Smith EE, Saposnik G, Biessels GJ, et al. Prevention of Stroke in Patients With Silent Cerebrovascular Disease: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2017;48:e44-e71.

35. Maestrini I, Altieri M, Di Clemente L, et al. Longitudinal Study on Low-Dose Aspirin versus Placebo Administration in Silent Brain Infarcts: The Silence Study. *Stroke research and treatment* 2018;2018:7532403-7532403.
36. Shinoda-Tagawa T, Yamasaki Y, Yoshida S, et al. A phosphodiesterase inhibitor, cilostazol, prevents the onset of silent brain infarction in Japanese subjects with Type II diabetes. *Diabetologia* 2002;45:188-194.
37. Ward SA, Raniga P, Ferris NJ, et al. ASPREE-NEURO study protocol: A randomized controlled trial to determine the effect of low-dose aspirin on cerebral microbleeds, white matter hyperintensities, cognition, and stroke in the healthy elderly. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 2017;12:108-113.
38. Reid CM, Storey E, Wong TY, et al. Aspirin for the prevention of cognitive decline in the elderly: rationale and design of a neuro-vascular imaging study (ENVIS-ion). *BMC neurology* 2012;12:3-3.
39. Fores R, Alzamora MT, Pera G, Baena-Diez JM, Mundet-Tuduri X, Toran P. Contribution of the ankle-brachial index to improve the prediction of coronary risk: The ARTPER cohort. *PloS one* 2018;13:e0191283.
40. Fowkes FGR, Murray GD, Butcher I, et al. Development and validation of an ankle brachial index risk model for the prediction of cardiovascular events. *Eur J Prev Cardiol* 2014;21:310-320.
41. Gerdes VE, Kwa VI, ten Cate H, Brandjes DP, Buller HR, Stam J. Cerebral white matter lesions predict both ischemic strokes and myocardial infarctions in patients with established atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 2006;186:166-172.
42. Riba-Llena I, Nafria C, Mundet X, et al. Assessment of enlarged perivascular spaces and their relation to target organ damage and mild cognitive impairment in patients with hypertension. *European journal of neurology* 2016;23:1044-1050.

**SILENT BRAIN INFARCTS, PERIPHERAL VASCULAR DISEASE AND THE RISK  
OF CARDIOVASCULAR EVENTS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION**

Jimenez-Balado J, Riba-Llena I, Nafría C, Sánchez-Ballesteros S, Pizarro J, Mundet X, Violan C,  
Montaner J, Delgado P

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

---

**Supplementary Table 1: Risk of Cardiovascular event after 5 years of follow-up**

Variable	5-year risk of CVE, % (95% CI)	P-value
<b>Age:</b>		
<64	8.3 (5.8;10.8)	0.889
≥64	8.0 (5.5;10.5)	
<b>Gender</b>		
Female	4.1 (2.3;5.9)	<0.001
Male	12.3 (9.2;15.4)	
<b>Diabetes</b>		
Absent	5.9 (4.1;7.7)	<0.001
Present	15.5 (10.6;20.4)	
<b>Smoking Habit</b>		
No	6 (4.2;7.8)	<0.001
Yes	20.2 (13.3;27.1)	
<b>SBP control</b>		
Good	8 (5.5;10.5)	0.869
Poor	8.3 (5.8;10.8)	
<b>DBP control</b>		
Good	7.6 (5.8;9.4)	0.019
Poor	14.3 (6.7;21.9)	
<b>Dyslipidemia</b>		
Absent	5.9 (3;8.8)	0.14
Present	8.9 (6.7;11.1)	
<b>HDL-Cholesterol</b>		
1st Quartile	14.8 (10.1;19.5)	<0.001
2nd Quartile	6 (2.9;9.1)	
3rd Quartile	8 (4.5;11.5)	
4th Quartile	4.1 (1.6;6.6)	
<b>Waist Circumference</b>		
1st Quartile	5.5 (2.4;8.6)	0.015
2nd Quartile	7.9 (4.4;11.4)	
3rd Quartile	6.7 (3.4;10)	
4th Quartile	13.3 (8.6;18)	
<b>Previous CVD</b>		
No	6.6 (4.8;8.4)	<0.001
Yes	23.7 (14.5;32.9)	
<b>BPLD Adherence</b>		
Good	7.1 (4.6;9.6)	0.462
Poor	8.6 (6.1;11.1)	
<b>Atrial Fibrillation</b>		
Absent	8 (6.2;9.8)	0.48
Present	11.7 (0.9;22.5)	

Values represent the differences in rate of cardiovascular events (1 minus survival at 5<sup>th</sup> year according to Kaplan-Meier estimator) by markers of target organ damage. P-values have been calculated according to log-rank test.

Key: BPLD, blood pressure lowering drugs; CVE, cardiovascular event; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high density lipoprotein; PVH, periventricular white matter hyperintensities; SBP, systolic blood pressure.

<b>Supplementary Table 2: Sensitivity analyses excluding patients with stroke</b>		
<b>Variables</b>	<b>HR (95% CI)</b>	<b>P-value</b>
<b>Clinical Model</b>		
Diabetes Mellitus	2.46 (1.41; 4.29)	0.002
Sex, male	1.73 (0.90; 3.14)	0.1
Previous Ischaemic Cardiopathy	3.97 (2.15; 7.33)	<0.001
Active Smoker	4.23 (2.37; 7.54)	<0.001
Poor DBP control	1.82 (0.85; 3.91)	0.13
<b>Clinical Model+TOD</b>		
Silent Brain Infarcts	2.64 (1.14; 6.10)	0.023
ABI <0.9	2.84 (1.39; 5.81)	0.004

Values represent hazard ratios and 95% confidence intervals.

Clinical model included sex, age, poor diastolic blood pressure control, diabetes mellitus, smoking habit, previous ischemic cardiopathy, cholesterol, HDL-cholesterol and waist circumference. Clinical+TOD model additionally included those markers of TOD associated with cardiovascular events in the univariate analysis —silent brain infarcts, periventricular hyperintensities, basal ganglia enlarged perivascular spaces, ankle brachial index<0.9 and microalbuminuria—. Variables were selected by backward stepwise elimination.

**Supplementary Table 3: Sensitivity analyses excluding patients with previous ischemic cardiopathy**

<b>Variables</b>	<b>HR (95% CI)</b>	<b>P-value</b>
<b>Clinical Model</b>		
Diabetes Mellitus	2.03 (1.15; 3.55)	0.014
Sex, male	2.59 (1.35; 4.96)	0.004
Active Smoker	4.48 (2.54; 7.89)	<0.001
Age, per year	1.04 (0.99; 1.10)	0.121
Poor DBP control	2.28 (1.13; 4.59)	0.021
<b>Clinical Model+TOD</b>		
Silent Brain Infarcts	3.02 (1.45; 6.32)	0.003
ABI <0.9	2.38 (1.12; 5.05)	0.024

Values represent hazard ratios and 95% confidence intervals.

Clinical model included sex, age, poor diastolic blood pressure control, diabetes mellitus, smoking habit, previous ischemic cardiopathy, cholesterol, HDL-cholesterol and waist circumference. Clinical+TOD model additionally included those markers of TOD associated with cardiovascular events in the univariate analysis —silent brain infarcts, periventricular hyperintensities, basal ganglia enlarged perivascular spaces, ankle brachial index<0.9 and microalbuminuria—. Variables were selected by backward stepwise elimination.







**Prevalence Of Hippocampal Enlarged Perivascular Spaces In A Sample Of  
Patients With Hypertension And Their Relation With Vascular Risk  
Factors And Cognitive Function**

(Jiménez-Balado J, et al. Journal of neurology, neurosurgery,  
and psychiatry 2018, 89 (6): 651-656)

DOI: 10.1136/jnnp-2017-316724

---





## **SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 5.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

### 5.1.1. Determinar la progresión radiológica de la enfermedad de pequeño vaso cerebral en población hipertensa española.

- *Prevalencia de la Progresión de las Lesiones de la Sustancia Blanca:*

Nuestros resultados muestran que la progresión de las LSB es un fenómeno altamente prevalente en población hipertensa española (**Artículo 1**). El 51% de los sujetos mostró algún grado de progresión (menor o marcado) de las LSB. La prevalencia de la progresión varió en función de la región anatómica estudiada. Específicamente, el 22% y el 48% de los sujetos mostraron cambios a nivel periventricular y subcortical, respectivamente.

Esta prevalencia sería ligeramente superior a la reportada por otros estudios que han realizado valoraciones cualitativas. Por ejemplo, el estudio de Rotterdam reportó tasas de progresión de las LSB periventriculares y subcorticales del 27% y del 32%, respectivamente. Esto podría ser debido a las características de nuestra población, formada exclusivamente por pacientes hipertensos<sup>73</sup>. Aun así, cabe mencionar que otras características de la metodología podrían estar influenciando en esta discrepancia, como por ejemplo que el estudio de Rotterdam presentaba un tiempo de seguimiento menor (3.4 años de seguimiento medio vs 4). En otros estudios llevados a cabo en pacientes con FRV se observarían tasas de progresión más análogas a las observadas<sup>101</sup>.

- *Incidencia de infartos y microsangrados cerebrales:*

En el **Artículo 1** reportamos una incidencia anual de ICS y MSC del 1.5% y 1.4%, respectivamente.

En el caso de los ICS esta incidencia sería inferior a lo esperado, siendo más parecida a la observada en estudios en población general que a la de población con FRV<sup>73, 101</sup>. Es interesante comentar que ya en la visita basal se observó una prevalencia de ICS inferior a la esperada (10.1%)<sup>7</sup>. Esto podría ser debido a las características de los participantes del estudio ISSYS que, pese a ser hipertensos, muestran presiones medias más bajas que en otros estudios y el 95% tenían pautado un tratamiento hipotensor. También cabría mencionar que en el seguimiento hemos visto como el perfil lipídico de la muestra mejoraba (**Artículo 1**), aspecto que podría estar influenciando en esta incidencia. Esta mejora podría ser debida a un sesgo de nuestro estudio que, pese a no administrar tratamientos o intervenciones específicas, incluye muchos pacientes que después de la visita basal tuvieron una mejoría en la adherencia, tratamientos y recomendaciones de prevención vascular a lo largo del seguimiento.

Por otro lado, observamos incidencias anuales de MSC claramente inferiores a las reportadas previamente, las cuales suelen oscilar entorno al 3%<sup>75, 93, 101</sup>. Esto es muy posible que sea debido a las limitaciones técnicas en la adquisición de la resonancia magnética del estudio ISSYS. En primer lugar, podría estar afectando el grosor de los cortes —de 5 mm con un “gap” de 1.5 mm— que complica la visualización de estas pequeñas lesiones, así como a la baja resolución de la secuencia de GRE utilizada

- *Progresión de los Espacios Perivasculares Dilatados:*

En el **Artículo 2** hemos reportado que el 18.3% de nuestra cohorte mostró un cambio en los EPVD de los ganglios de la base. En cambio, la progresión de los EPVD del CSO fue mucho menos prevalente, observándose solo en el 3% de los pacientes.

Actualmente no existen estudios con los que comparar estos resultados. Es interesante, no obstante, resaltar la diferencia entre ambas regiones anatómicas. Los EPVD de los GB han sido más relacionados con la vasculopatía hipertensiva, mientras que los del CSO se han relacionado preferentemente con la angiopatía amiloide cerebral o la enfermedad de Alzheimer<sup>67, 68, 206</sup>. Este mayor efecto de la hipertensión en las regiones de los GB podría ser debido a que la onda de pulso cuando entra en el cerebro se encuentra primero con las arterias lenticuloestriadas perforantes, las cuales irrigan los ganglios de la base, siendo más susceptibles al estrés hemodinámico en comparación a las arterias distales<sup>66</sup>.

No obstante, cabe mencionar que en este trabajo hemos adaptado una escala cualitativa —que establece diferentes categorías, basándose en el número de EPVD—, la cual es usada en estudios transversales<sup>58</sup>. Este método puede conllevar diferentes tipos de limitaciones, como por ejemplo una escasa sensibilidad para las progresiones leves de este marcador o el efecto techo hallado en caso de encontrar un elevado número de EPVD en la RMC basal. Para estudios futuros serán muy interesantes los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de cuantificación automática que poco a poco se vayan desarrollando.

- *Progresión Global de la Enfermedad de Pequeño Vaso Cerebral:*

En el **Artículo 2** hemos construido un score de progresión que refleja la progresión global de la EPVC, de manera similar a otros sistemas de evaluación de la carga de las lesiones<sup>69</sup>. De este modo hemos establecido que el 26.2% de los pacientes muestran una progresión significativa en 1 tipo de lesión y el 9.9% en 2 o más tipos de lesiones. La combinación más frecuente de lesiones es la progresión de las LSB y los EPVD de los GB.

### 5.1.2. Observar si la progresión radiológica correlaciona con la evolución cognitiva y la aparición de deterioro cognitivo leve.

- *Aparición de Deterioro Cognitivo Leve en la muestra:*

En el estudio ISSYS hemos observado tasas de incidencia de DCL anuales del 2.3% (**Artículo 1**) que serían equivalentes a las reportadas en estudios previos en población general —las cuales suelen estar entre el 2 y el 7% en población de edad avanzada—<sup>186, 187</sup>. No observamos asociaciones significativas entre las principales variables demográficas y FRV con el diagnóstico de DCL incidente. Tan solo pudimos ver que los pacientes con DCL incidente presentaban una menor escolarización y una mayor prevalencia de obesidad abdominal.

Cabe destacar que el 40% de los pacientes que presentaban DCL en la visita basal habían revertido a envejecimiento normal en la visita de seguimiento. Un reciente metaanálisis de estudios longitudinales ha reportado que el 18% de los pacientes con DCL revertirá en algún momento<sup>207</sup>. No obstante, del mismo modo que sucede con el DCL incidente, esta tasa varía en función de si se trata de estudios en la población general o en clínicas de memoria, dónde se encontrarían prevalencias de reversión del 31 y 14%, respectivamente. Estas mayores tasas de reversión que se observan en los estudios llevados a cabo en la población general se cree que podrían ser debidas a falsos positivos<sup>207</sup>. Así pues, la elevada reversión a envejecimiento normal observada en el estudio ISSYS podría ser debida a esto. Otra hipótesis podría estar relacionada con el perfil de deterioro cognitivo de nuestros pacientes, en la mayoría de casos de tipo fronto-subcortical. Este predominio sería el más frecuente en el DCVa —así como en otras patologías como la depresión, que pueden complicar el diagnóstico—, y suele pensarse que estos pacientes tienden más a la fluctuación que en comparación a otras causas de demencia.

Al margen de las transiciones observadas en los diferentes tipos de estudios, es importante entender el DCL como un diagnóstico que puede revertir o fluctuar, y que esta fluctuación no está exenta de riesgos, ya que se ha reportado que el riesgo de demencia incidente de los pacientes con reversión a envejecimiento normal se encontraba por encima de las personas con envejecimiento normal estable<sup>208</sup>. Así pues, el pronóstico de los pacientes con DCL o de los que revierten podrá ser muy variable, y cabe considerarlo a la hora de informar a los pacientes.

Finalmente, quedaría destacar que sería muy interesante conocer los perfiles de pacientes que tienden a fluctuar. Por ejemplo, algunos estudios han reportado que factores como la mejora de los síntomas depresivos o una vida social activa podrían estar relacionados con la reversión a envejecimiento normal<sup>209</sup>. Otro grupo de investigación, por medio de cadenas de Markov, estudió qué patrones de alteración neuropsicológicas tienden a fluctuar más<sup>210</sup>.



- *Correlación radiológica con el declive de las funciones cognitivas:*

En el **Artículo 1** reportamos que la progresión de las LSB-PV correlaciona con el declive de las funciones ejecutivas. Análogamente, los pacientes con MSC incidentes empeoraban más en funciones atencionales durante el seguimiento.

Estos resultados estarían alineados con la bibliografía previa, en la que existe un abundante número de artículos que reportan que la progresión de las LSB se relaciona principalmente con el declive de las funciones ejecutivas (atención, velocidad de procesamiento de la información, etcétera)<sup>10, 39, 179</sup>. No obstante, aunque la mayoría de estudios metaanalíticos reafirman estos resultados, cabe mencionar que esta relación estaría altamente condicionada a otras variables como la edad o la reserva cognitiva<sup>211</sup>. Otro factor relevante podría ser la distribución espacial de las lesiones. Es interesante comentar que, por ejemplo, en el **Artículo 1** hemos visto que las LSB-SC de la región occipital se relacionan con el declive de las funciones atencionales, y en cambio, cuando estudiamos las LSB-SC globalmente —sin diferenciar las localizaciones— no se observaron asociaciones.

Los MSC incidentes posiblemente han sido uno de los marcadores de la EPVC que menos se han estudiado en relación al deterioro cognitivo. Aun así, diversos estudios metaanalíticos han reportado asociaciones significativas entre la presencia de MSC y el riesgo aumentado de demencia o el declive de las funciones ejecutivas, aunque existiendo una gran heterogeneidad entre estudios<sup>212, 213</sup>.

- *Relación entre la progresión radiológica y la incidencia de deterioro cognitivo leve:*

En el **Artículo 1** pudimos ver como los pacientes con una progresión marcada de las LSB-PV presentaban un riesgo 6 veces superior de DCL incidente.

De este modo, contrastarían los resultados que se observan entre la progresión de las LSB-PV y LSB-SC. Es interesante destacar que la literatura previa ha encontrado asociaciones más significativas entre el riesgo de demencia o el declive funcional y las LSB-PV<sup>214, 215</sup>. En el **Artículo 1** hemos visto que este efecto ya se observa en las fases leves del deterioro cognitivo. Diversos argumentos nos pueden ayudar a entender la diferencia entre las LSB-PV y LSB-SC.

Una hipótesis que explique este efecto podría ser anatómica. Las LSB-SC se encuentran en regiones cerebrales en las que principalmente se dañan conexiones cortico-corticales de regiones adyacentes (fibras U)<sup>216</sup>. En cambio, las regiones periventriculares se tratarían de áreas de asociación cortico-subcorticales<sup>217</sup>. Así pues, las LSB-PV podrían estar dañando fibras que conectasen regiones corticales con los núcleos subcorticales, más implicados en el DCVa. Otra

hipótesis complementaria a la anterior sería que las LSB-PV estén interrumpiendo las fibras adyacentes de la vía colinérgica ascendente, la cual se ha relacionado en diversos estudios con el DCVa u otros tipos de demencia<sup>218, 219</sup>. No obstante, cabe destacar que estas vías también se encontrarían en diferentes regiones subcorticales, aunque no en todas.

Otra explicación que se podría mencionar sería que algunas investigaciones apuntan que las LSB-PV y SC podrían tener fisiopatologías diferentes. De este modo, por ejemplo, las LSB-PV se han asociado con la colagenosis venosa, que induciría la isquemia y alteraría el curso de la circulación del líquido intersticial<sup>51</sup>. Esta alteración podría acelerar la deposición del péptido A $\beta$  en el cerebro, propiciando el deterioro de las funciones superiores<sup>191</sup>.

En contrapartida a la diferenciación de las LSB-PV y SC, algunos autores han intentado demostrar mediante el uso de técnicas de neuroimagen tridimensionales que la diferenciación entre ambos tipos de lesiones es fruto de la valoración en el plano axial de la RMC, pero en realidad existe continuación entre ambas<sup>51, 220</sup>.

Con todo, podemos decir que la progresión radiológica de la EPVC correlaciona con la evolución clínica. No obstante, esta asociación va a depender de diversos factores como el tipo de lesión o el volumen del parénquima afectado. Así pues, aunque cabe entender la EPVC y sus cambios como un todo, diferentes lesiones y niveles de progresión tendrán consecuencias específicas. Además, hemos visto que el efecto de estas lesiones ya se produce en las fases leves del deterioro cognitivo. Así pues, sería muy interesante estudiar los mecanismos por los cuales las LSB-PV propician la aparición del DCL.

## **5.2. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO, MECANISMOS O MARCADORES QUE PERMITAN MONITORIZAR LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD**

### **5.2.1. Papel de la monitorización ambulatoria de la presión arterial.**

En el **Artículo 2** hemos visto como la MAPA, determinada en el tiempo basal, predice la progresión de la EPVC. De entre las diferentes métricas estudiadas vimos que todos los componentes basales de PAS y PAD se relacionaban con la progresión global de la EPVC — evaluada con el score de la EPVC adaptado a la progresión—. El parámetro más asociado fue la PAD de 24h, que por cada incremento de 10 mm de Hg se dobla el riesgo de padecer una nueva lesión incidente.

Aunque en el **Artículo 1** hemos establecido que la progresión de algunas lesiones correlaciona con la evolución clínica, es difícil encontrar una aplicación clínica a estos resultados si

consideramos que la evaluación seriada con RMC es poco viable debido a su elevado coste. Así pues, se requieren variables clínicas que permitan estratificar el riesgo de progresión de la EPVC. Es interesante destacar que en nuestro estudio hemos visto que la presión del consultorio no se asociaría al riesgo de progresión. De hecho, hemos visto que los pacientes que no tienen lesiones incidentes tienen un mayor efecto de bata blanca —es decir, una mayor presión en el consultorio que ambulatoria diurna—. Esto es debido a que los pacientes con progresión posiblemente son aquellos que muestran un verdadero mal control de la presión arterial. La pregunta que podríamos hacernos es hasta qué punto las medidas de presión arterial del consultorio, contaminadas por diversos tipos de estímulos ambientales, nos pueden ayudar a determinar a quién colocar la MAPA. En este contexto sería muy interesante explorar otras opciones de cribado, como por ejemplo la presión domiciliaria o incluso la presión o la variabilidad de la presión del consultorio visita a visita<sup>221</sup>.

Otro aspecto a destacar es que hemos definido el control de la presión basándonos en las guías americanas clínicas recientes<sup>106</sup>. Cabe mencionar que dos ensayos clínicos recientes —INFINITY y SPRINT— han demostrado que objetivos de presión más bajos se traducen en una menor progresión de las LSB<sup>222, 223</sup>. En contrapartida a estos resultados, algunos autores han defendido que bajar la presión arterial excesivamente en edades avanzadas puede conllevar un aumento de las LSB y del deterioro cognitivo<sup>224</sup>. Posiblemente también cabe destacar que diferentes componentes de la presión arterial (PAS, PAD, presión de pulso...) podrían tener valores predictivos específicos en función del tipo de lesión de la EPVC, debido a las características anatómicas de los pequeños vasos del cerebro<sup>18</sup>.

En el **Artículo 2** también hemos reportado que la presión de pulso nocturna se asocia a progresiones más marcadas de la EPVC. La presión de pulso se considera un marcador de rigidez arterial y, como otros componentes de la presión arterial, sigue un ritmo circadiano. En estudios anteriores se ha visto que la PAS nocturna muestra relaciones más significativas con el volumen y progresión de las lesiones de la sustancia blanca<sup>225</sup> o el riesgo de eventos cardiovasculares<sup>226</sup>. Es interesante también comentar que en resultados previos del estudio ISSYS vimos como la presión de pulso nocturna se asociaba al DCL<sup>227</sup>.

No obstante, a pesar del valor predictivo de la MAPA, la inclusión de sus parámetros en un modelo clínico sólo ha aumentado la discriminación de los pacientes con progresión de la EPVC en un 4.5%. Esta mejora, aunque significativa, debería mejorarse con otros parámetros clínicos o de biomarcadores para lograr una correcta estratificación del riesgo de lesiones subclínicas

incidentes en el paciente hipertenso. De forma análoga, debería explorarse si existe asociación de la PA de 24 horas con el declive de la función cognitiva

**5.2.2. Estudiar si el declive de la función renal —determinada por medio de diferentes biomarcadores— es paralelo a la incidencia de lesiones silentes.**

En el **Artículo 3** hemos visto que los pacientes con microalbuminuria en el seguimiento presentan mayores probabilidades de progresión de las LSB-PV. Cabe mencionar que los cambios en el cociente de la albúmina y creatinina no estaban asociados con las lesiones. Esto podría sugerir que la relación entre la albuminuria y las LSB-PV dependería de un punto de corte, más que ser continua. Es interesante destacar que no encontramos una relación estadísticamente significativa entre la microalbuminuria y las LSB-SC. Aunque sí se observaba una diferencia no significativa, podríamos relacionar estos resultados con el hecho de que ambos tipos de lesiones presentan FRV distintos, tal y como hemos defendido en puntos anteriores.

En estudios anteriores se ha visto que los marcadores de función renal predicen el riesgo de demencia, especialmente de tipo vascular<sup>228, 229</sup>. En el **Artículo 3** también hemos visto como el cambio en la albuminuria y filtrado glomerular se relacionaban con el declive de la memoria y el diagnóstico de DCL incidente, respectivamente. Por tanto, estos marcadores podrían resultar herramientas útiles para identificar el DCL de tipo vascular, si bien para confirmar esta hipótesis serían precisos estudios comparativos en pacientes con DCL de diferentes etiologías (vascular, degenerativo, etc...) con y sin enfermedad renal crónica<sup>230</sup>.

No obstante, cabría ser muy cauto a la hora de dibujar las conclusiones de estos resultados. A pesar del interés de haber reportado que los cambios en los marcadores de función renal evolucionan paralelamente al declive cognitivo y al aumento de lesiones subclínicas, estas relaciones no deben interpretarse en el contexto de la causalidad. Esto es debido a la dificultad de determinar la causalidad en los estudios observacionales, aunque sean longitudinales. Posiblemente lo que estamos viendo en el **Artículo 3** es que tanto el cerebro como el riñón muestran declives subclínicos paralelos debido a FRV o etiologías comunes, y esto se manifiesta en un empeoramiento progresivo de la EPVC, de los marcadores de función renal y de la cognición.

Sin embargo, estos análisis nos podrían dar a entender que en un futuro sería interesante monitorizar los marcadores de función renal para conocer si un paciente tiene más riesgo de

empeorar a nivel cerebrovascular o cognitivo o incluso testar el efecto de intervenciones específicas.

**5.2.3. Analizar el proteoma de pacientes con progresión de las lesiones de la sustancia blanca con el objetivo de descubrir nuevas vías, proteínas y mecanismos implicados en la enfermedad de pequeño vaso cerebral.**

En el **Artículo 4** hemos estudiado el proteoma de los pacientes con una progresión marcada de las LSB, la principal lesión de la EPVC. En la fase de descubrimiento hemos propuesto tres proteínas candidatas que podrían estar asociadas con la progresión de la EPVC —la metaloproteinasa 9 (MMP9), el receptor del factor de crecimiento del hepatocito (MET) y la ceramidasa neutral (ASAH2)—.

En primer lugar, cabe mencionar que en el estudio proteómico del SOMAscan hemos visto pocas proteínas y vías asociadas con la progresión de las LSB. Esto podría estar indicando que los casos y controles estarían presentando fenotipos similares. Esta dificultad a la hora de encontrar mecanismos implicados en la EPVC puede ser debido al carácter crónico y subclínico de esta enfermedad. Al progresar de manera lenta en el tiempo, posiblemente sea difícil encontrar proteínas plasmáticas que permitan la identificación de procesos relacionados con su fisiopatología. Así pues, esto nos daría una pequeña pista para futuros estudios, en los que posiblemente sea adecuado elegir sujetos con progresiones todavía más marcadas o considerar otros tipos de muestra como el líquido céfalo raquídeo. También sería necesario ampliar el tamaño muestral para ser capaces de ver diferencias pequeñas.

En la fase de validación hemos visto que ningún candidato predice la progresión de las LSB, es decir, la concentración basal de estas proteínas es equivalente entre pacientes con y sin progresión en el seguimiento —aunque se observaría una diferencia no significativa en el caso de la MMP9—. No obstante, sí pudimos observar que el perfil temporal de estas proteínas varía en función del grado de progresión de las LSB.

Por ejemplo, hemos visto como la concentración de MET muestra un declive paralelo a la progresión de las LSB. MET se trataría del receptor del factor de crecimiento del hepatocito (HGF), el cual se expresa en muchos tejidos. La unión de HGF/MET estaría involucrada en diferentes procesos a través de la vía PI3K/AKT (del inglés: phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/Protein Kinase B), como la plasticidad sináptica, la supervivencia neuronal, la angiogénesis, entre otros procesos<sup>231</sup>. Así pues, la disminución en el tiempo de la concentración de esta proteína podría estar indicando una menor activación de esta vía, con la consecuente

disminución de los procesos neurotróficos y de angiogénesis. Es interesante comentar que en diferentes estudios transversales se ha asociado una mayor concentración de HGF con la enfermedad de Alzheimer o con las lesiones radiológicas de la EPVC<sup>232, 233</sup>. Nuestra propuesta sería que la concentración de HGF podría estar aumentada en estas patologías debido a la disminución de MET, su principal receptor. Debido a la relación de estas proteínas con la enfermedad de Alzheimer y la EPVC, así como por la asociación bidireccional entre ambas patologías, será muy interesante evaluar a la vez estos marcadores en futuros estudios.

También hemos visto que los pacientes con progresión de las LSB presentaban mayores concentraciones de MMP9 en la visita de seguimiento. Un estudio transversal previo presentó unos resultados en concordancia a los nuestros, observando mayores concentraciones de MMP9 en sujetos con más volumen de LSB<sup>151</sup>. Estos resultados tendrían sentido si consideramos que la MMP9 es un marcador de ruptura de la BHE, que es uno de los procesos que se cree que está implicado en la fisiopatología de la EPVC<sup>14, 234</sup>.

#### **5.2.4. La predicción de la Enfermedad de Pequeño Vaso Cerebral.**

Hasta este punto hemos visto que la progresión subclínica de la EPVC conlleva una serie de consecuencias que motivan el interés por establecer su curso evolutivo y mecanismos fisiopatológicos. No obstante, a día de hoy estaríamos lejos de producir un modelo clínico que permitiera la estratificación del riesgo de progresión de la EPVC en el paciente hipertenso. Quizá la primera pregunta qué deberíamos hacernos es qué es lo que queremos predecir. Hemos visto que no todas las lesiones tienen las mismas consecuencias y los mismos factores de riesgo. Así pues, una opción es que la predicción se realice de manera individualizada para cada tipo de marcador. Otra opción sería optimizar las herramientas para explorar la evolución conjunta de la EPVC, ya que podría tener un impacto clínico más significativo.

Otro problema que complica la predicción es que el estudio de la EPVC se realiza a través de evaluar sus consecuencias, las lesiones radiológicas. A día de hoy no se pueden evaluar in vivo los pequeños vasos del cerebro, así que se debería intentar estudiar cuáles son los marcadores radiológicos más precoces de la EPVC. De esta manera podríamos definir el gradiente de evolución de las lesiones de la EPVC. Diversos autores han propuesto que los EPVD podrían representar un marcador precoz de la EPVC, aunque la falta de métodos para evaluar los cambios de los EPVD complica la comprensión de las relaciones de este marcador con el resto de lesiones. Conocer la dinámica de evolución de la EPVC nos permitiría saber con más claridad lo que queremos predecir.

### 5.3. ESTUDIAR EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON LESIONES CEREBROVASCULARES SILENTES

#### 5.3.1. Determinar si existe asociación entre las lesiones de la enfermedad de pequeño vaso cerebral y el riesgo de evento cardiovascular.

En el **Artículo 5**, por medio de la información recogida en las visitas de seguimiento telefónicas, hemos visto que el 8.2% de los pacientes del estudio ISSYS ha presentado un evento cardiovascular. Esto correspondería a una incidencia anual de eventos entre el 1.5 y 2%. El 58.8% de éstos fueron eventos mayores (ictus o infarto agudo de miocardio).

Por medio del análisis de supervivencia pudimos ver que los pacientes con ICS tenían un riesgo triplicado de padecer un evento cardiovascular. Cuando los ICS eran introducidos en un modelo clínico junto con otros marcadores de daño de órgano diana —microalbuminuria, índice tobillo-brazo $<0.9$  u otras lesiones de la EPVC— se mejoraba la discriminación de los pacientes con eventos cardiovasculares en un 4.7%. Cabe destacar que esta relación entre los ICS y el riesgo cardiovascular se mantenía cuando excluimos a los pacientes con ictus.

En nuestro estudio pudimos observar que los ICS y el índice tobillo-brazo $<0.9$ , como marcadores de daño subclínico, se mantenían ambos en un mismo modelo corregido por la información clínica, lo que sugiere que explican información diferente. El índice tobillo brazo se considera una medida no invasiva de la arteriopatía periférica, la cual dispone de muchos estudios que abalan su relación con el riesgo cardiovascular<sup>235, 236</sup>. Los ICS, en cambio, reflejan el daño subclínico del cerebro.

Aunque las asociaciones eran más débiles, también hemos visto como los pacientes con LSB-PV o EPVD de los ganglios de la base presentaban un riesgo doble de evento cardiovascular. Algunos artículos previos también han reportado relaciones más significativas entre las LSB-PV y el riesgo cardiovascular en comparación a las LSB-SC<sup>162</sup>. No obstante, en nuestro caso estas lesiones perdían su valor predictivo en el contexto de los ICS.

- *Prevención Secundaria de la enfermedad de pequeño vaso cerebral:*

Cabe preguntarse si es conveniente aplicar estrategias de prevención secundaria en los pacientes con ICS. Esta idea quedaría respaldada por otras consecuencias negativas de los ICS, como el riesgo aumentado de demencia<sup>237</sup>. Sin embargo, hoy en día las únicas recomendaciones que existen en el manejo de estos pacientes son el control exhaustivo de los FRV y asegurarnos que, en vez de tratarse de un infarto subclínico, no se trate de un ictus cuyos síntomas no fueron identificados como tales <sup>36, 238, 239</sup>. A día de hoy existen pocos ensayos clínicos que hayan

evaluado la eficacia de estrategias de prevención secundaria en los ICS, como el uso de la aspirina<sup>240</sup>. Así pues, serán muy interesantes algunos estudios que se están llevando a cabo para conocer el beneficio de estos tratamientos que podrían mejorar el manejo de los pacientes con EPVC<sup>160, 241</sup>.

#### **5.4. PROPONER NUEVOS MARCADORES RADIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE PEQUEÑO VASO CEREBRAL**

##### **5.4.1. Definir la prevalencia de los espacios perivasculares dilatados del hipocampo y observar si se asocian al resto de marcadores radiológicos de la enfermedad.**

En una muestra de 723 sujetos del estudio ISSYS evaluamos de manera transversal el número de EPVD del hipocampo (**Artículo 6**). De este modo pudimos ver que se trata de un tipo de marcador radiológico altamente prevalente en población hipertensa, encontrando que el 84.6% de los pacientes mostraban un EPVD del hipocampo como mínimo. La mediana del número de estas lesiones fue de 4. Aunque existe muy poca bibliografía, es similar a lo que han reportado otros estudios en población general<sup>242</sup>.

Pudimos ver que estas lesiones se asociaban con las LSB, tanto periventriculares como subcorticales, y con los EPVD de otras regiones. Esto podría ser sugestivo de que los EPVD del hipocampo forman parte del espectro de lesiones de la EPVC. También pudimos ver que su número se relacionaba con un peor rendimiento en funciones ejecutivas, aunque no se asociaban al diagnóstico de DCL.

Así pues, la evaluación de este marcador puede realizarse del mismo modo que otros marcadores de la EPVC. Posiblemente la razón de que la bibliografía sea más escasa sea debido a que los EPVD del hipocampo resultan más difíciles de evaluar que los de otras regiones neuroanatómicas, y pueden confundirse con remanentes del surco del hipocampo, una variante normal del neurodesarrollo<sup>243</sup>.

En relación a este objetivo, sería muy interesante evaluar la progresión de este marcador en futuros estudios y su relación con la función cognitiva o con aspectos clínicos de la EPVC. También podríamos observar si el aumento del número de los EPVD del hipocampo correlaciona con la progresión de otros marcadores.

#### **5.5. ESTUDIO ISSYS: PERSPECTIVAS, FORTALEZAS Y LIMITACIONES**

A través de estos artículos de la presente tesis doctoral, el estudio ISSYS ha dado sus primeros pasos en la investigación longitudinal de la EPVC. Esto le ha permitido reportar por primera vez



la progresión de las lesiones de pequeño vaso en población hipertensa española y esbozar los factores de riesgo, mecanismos implicados y consecuencias clínicas con los que se encuentra relacionada. No obstante, el seguimiento realizado de esta cohorte de casi 1000 pacientes hipertensos no es suficiente para lograr una comprensión completa de la patología cerebrovascular subclínica, siendo por tanto muy abundantes los retos y perspectivas futuras.

En primer lugar, sería muy interesante realizar más visitas en las que podamos repetir la RMC para estudiar, por ejemplo, la reversión de las lesiones o la aceleración de la progresión. También se podrían complementar estos estudios con pruebas de medicina nuclear como PET Florbetapir, o en su defecto, marcadores de amiloidosis o neurodegeneración cerebral —e.g., concentración del péptido A $\beta$  o de Tau y pTau en el líquido cefalorraquídeo—. De este modo podríamos conocer las interacciones entre los cambios de la EPVC, los marcadores de enfermedad de Alzheimer y el rendimiento cognitivo. Esto permitiría conocer si de verdad existen lesiones que se relacionan más con los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, así como conocer el curso y factores asociados de las diferentes causas de deterioro cognitivo.

También se podría mejorar el estudio de las consecuencias. En el **Artículo 5** hemos estudiado la incidencia de eventos cardiovasculares, pero no hemos investigado la incidencia de demencia. Esto ha sido debido a que en la cohorte del ISSYS todavía hay pocos casos de demencia incidente. En unos años posiblemente podremos abordar mejor este objetivo e intentar predecir la demencia a partir de la información de la visita basal. Además, en las llamadas telefónicas también se ha preguntado a los pacientes si tienen quejas subjetivas de memoria y se les ha administrado un test minimental telefónico. Estas variables podrían complementar el estudio de la demencia incidente.

El estudio de proteómica nos ha permitido encontrar proteínas que podrían seguir siendo estudiadas en el contexto de la EPVC. Posiblemente sería muy interesante en estudios futuros evaluar marcadores más sensibles de la EPVC, como por ejemplo la esquelización de la sustancia blanca con DTI<sup>83</sup>, intentando encontrar individuos con grados de progresión más marcadas. Otro aspecto muy importante es el momento en que se recogen las muestras. Posiblemente, debido al carácter progresivo de la EPVC, sería mejor tomar múltiples muestras durante el seguimiento. También sería interesante usar otras técnicas que permitan el estudio completo del proteoma, como por ejemplo la espectrometría de masas. Por lo tanto, será relevante seguir realizando estudios ómicos para la identificación de vías y mecanismos implicados en la progresión de la EPVC, ya que podría ayudar a predecir la evolución de la progresión radiológica, encontrar futuras dianas terapéuticas y comprender mejor esta patología.

Finalmente, en un grupo de pacientes disponemos de todas las variables estudiadas — progresión de la EPVC, exploración neuropsicológica completa, biomarcadores, MAPA, etcétera—. Así pues, en este grupo de pacientes podríamos intentar estudiar las relaciones presentadas en esta tesis de manera conjunta. De este modo se lograría una visión más integradora de los resultados presentados.

Las limitaciones del estudio ISSYS están focalizadas principalmente en el protocolo de la RMC. La baja resolución, la falta de imágenes tridimensionales en la visita basal y la falta de algunas secuencias (por ejemplo, DWI) ha disminuido nuestra sensibilidad y especificidad del diagnóstico neuroradiológico.

La principal fortaleza del estudio ISSYS es la variedad de información de la que dispone, que permite estudiar la EPVC des de múltiples puntos de vista. Otra fortaleza es que el diagnóstico de DCL se he realizado de manera clínica y no usando definiciones basadas únicamente en los tests cognitivos. Además, la metodología utilizada en la visita basal ha sido repetida de manera rigurosa para evitar la presencia de sesgos —e.g., se ha utilizado el mismo resonador, la misma batería neuropsicológica, etcétera—.





# CONCLUSIONES



**Las conclusiones de esta tesis doctoral son:**

1. La progresión de la enfermedad de pequeño vaso cerebral es un fenómeno altamente prevalente en población hipertensa en el seguimiento de 4 años realizado, observando que el 26.2% y el 9.9% de los pacientes muestran una progresión significativa en uno y dos o más marcadores radiológicos, respectivamente.
2. La progresión radiológica subclínica correlaciona con una peor evolución cognitiva, dependiendo esta relación del tipo, localización y volumen de las lesiones. De este modo, las lesiones de la sustancia blanca periventriculares son el tipo de marcador radiológico que muestra asociaciones más consistentes con el deterioro cognitivo.
3. La monitorización ambulatoria de la presión arterial podría representar una herramienta clínica útil para predecir la progresión de la enfermedad de pequeño vaso cerebral. No obstante, su información debería combinarse con otras variables clínicas o biomarcadores para obtener un modelo predictivo útil.
4. Los cambios de la función renal, la cognición y la enfermedad de pequeño vaso cerebral se encontrarían asociados. Este declive paralelo entre la patología renal y neurológica, quizá debido a causas o factores de riesgo comunes, podría ayudarnos a identificar poblaciones que precisan un seguimiento clínico más estrecho.
5. Hemos encontrado que el perfil temporal de las proteínas metaloproteinasa 9 (MMP-9), el receptor del factor de crecimiento hepatocito (MET) y ceramidasa neutral (ASAH-2) es diferente entre pacientes con y sin progresión de las lesiones de la sustancia blanca.
6. Los pacientes hipertensos con infartos cerebrales silentes tienen un riesgo triplicado de padecer un evento cardiovascular. Además, la inclusión de este marcador en un modelo clínico mejora la discriminación de los pacientes con mayor riesgo cardiovascular.
7. Los espacios perivasculares dilatados del hipocampo se encuentran relacionados con otras lesiones de la enfermedad de pequeño vaso cerebral y con la cognición. Será muy interesante evaluar su progresión en futuros estudios.





# **BIBLIOGRAFÍA**





1. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: From pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet. Neurology*. 2010;9:689-701
2. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: Insights from neuroimaging. *The Lancet. Neurology*. 2013;12:483-497
3. Fernández-Pardal MM, Bonardo P. Enfermedad cerebrovascular isquémica. In: Micheli F, ed. *Neurología*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2013.
4. Vega T, Zurriaga O, Ramos JM, Gil M, Alamo R, Lozano JE, Lopez A, Miralles MT, Vaca P, Alvarez Mdel M. Stroke in Spain: Epidemiologic incidence and patterns; a health sentinel network study. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2009;18:11-16
5. Vila-Corcoles A, Forcadell MJ, de Diego C, Ochoa-Gondar O, Satue E, Rull B, Barnes L, Jarrod M. [incidence and mortality of ischaemic stroke among people 60 years or older in the region of tarragona, Spain]. *Revista española de salud pública*. 2015;89:597-605
6. Arboix A, Martí-Vilalta JL. Lacunar stroke. *Expert review of neurotherapeutics*. 2009;9:179-196
7. Delgado P, Riba-Llena I, Tovar JL, Jarca CI, Mundet X, Lopez-Rueda A, Orfila F, Llusa 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 (Dallas, Tex. : 1979)*. 2014;64:658-663
8. de Leeuw FE, de Groot JC, Achten E, Oudkerk M, Ramos LM, Heijboer R, Hofman A, Jolles J, van Gijn J, Breteler MM. Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: A population based magnetic resonance imaging study. The rotterdam scan study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2001;70:9-14
9. Shi Y, Wardlaw JM. Update on cerebral small vessel disease: A dynamic whole-brain disease. *Stroke and vascular neurology*. 2016;1:83-92
10. DeBette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2010;341:c3666
11. Soriano JB, Rojas-Rueda D, Alonso J, Anto JM, Cardona PJ, Fernandez E, Garcia-Basteiro AL, Benavides FG, Glenn SD, Krish V, Lazarus JV, Martinez-Raga J, Masana MF,

- Nieuwenhuijsen MJ, Ortiz A, Sanchez-Nino MD, Serrano-Blanco A, Tortajada-Girbes M, Tyrovolas S, Haro JM, Naghavi M, Murray CJL. The burden of disease in Spain: Results from the global burden of disease 2016. *Medicina clinica*. 2018;151:171-190
12. Alvarez-Sabin J, Quintana M, Masjuan J, Oliva-Moreno J, Mar J, Gonzalez-Rojas N, Becerra V, Torres C, Yébenes M. Economic impact of patients admitted to stroke units in Spain. *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care*. 2017;18:449-458
13. Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, Llamas Velasco S, Llanero Luque M, Lopez de Silanes de Miguel C, Prieto Jurczynska C. Report by the Spanish Foundation of the Brain on the social impact of Alzheimer disease and other types of dementia. *Neurologia (Barcelona, Spain)*. 2017
14. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: Mechanisms and clinical implications. *The Lancet. Neurology*. 2019
15. Ostergaard L, Engedal TS, Moreton F, Hansen MB, Wardlaw JM, Dalkara T, Markus HS, Muir KW. Cerebral small vessel disease: Capillary pathways to stroke and cognitive decline. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36:302-325
16. Pantoni L, Sarti C, Alafuzoff I, Jellinger K, Muñoz DG, Ogata J, Palumbo V. Postmortem examination of vascular lesions in cognitive impairment: A survey among neuropathological services. *Stroke*. 2006;37:1005-1009
17. Ringelstein EB, Weiller C. Lenticulostriate arteries. In: Bogousslavsky J, Caplan L, eds. *Stroke syndromes*. New York: Cambridge University Press; 1995.
18. Blanco PJ, Müller LO, Spence JD. Blood pressure gradients in cerebral arteries: A clue to pathogenesis of cerebral small vessel disease. 2017;2:108-117
19. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2013;62:810-817
20. Attems J, Jellinger K, Thal DR, Van Nostrand W. Review: Sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2011;37:75-93

21. Keage HA, Carare RO, Friedland RP, Ince PG, Love S, Nicoll JA, Wharton SB, Weller RO, Brayne C. Population studies of sporadic cerebral amyloid angiopathy and dementia: A systematic review. *BMC neurology*. 2009;9:3
22. Wilson D, Charidimou A, Werring DJ. Advances in understanding spontaneous intracerebral hemorrhage: Insights from neuroimaging. *Expert review of neurotherapeutics*. 2014;14:661-678
23. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, Viswanathan A, Greenberg SM. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain : a journal of neurology*. 2017;140:1829-1850
24. Di Donato I, Bianchi S, De Stefano N, Dichgans M, Dotti MT, Duering M, Jouvent E, Korczyn AD, Lesnik-Oberstein SA, Malandrini A, Markus HS, Pantoni L, Penco S, Rufa A, Sinanovic O, Stojanov D, Federico A. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (cadasil) as a model of small vessel disease: Update on clinical, diagnostic, and management aspects. *BMC medicine*. 2017;15:41
25. Moreton FC, Razvi SS, Davidson R, Muir KW. Changing clinical patterns and increasing prevalence in cadasil. *Acta neurologica Scandinavica*. 2014;130:197-203
26. Peters N, Opherck C, Danek A, Ballard C, Herzog J, Dichgans M. The pattern of cognitive performance in cadasil: A monogenic condition leading to subcortical ischemic vascular dementia. *The American journal of psychiatry*. 2005;162:2078-2085
27. Tan RY, Markus HS. Cadasil: Migraine, encephalopathy, stroke and their inter-relationships. *PloS one*. 2016;11:e0157613
28. Opherck C, Peters N, Herzog J, Luedtke R, Dichgans M. Long-term prognosis and causes of death in cadasil: A retrospective study in 411 patients. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127:2533-2539
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. *The Lancet. Neurology*. 2013;12:822-838
30. Bamford J. Classic lacunar syndromes. In: Bogousslavsky J, Caplan L, eds. *Stroke syndromes*. New York: Cambridge University Press; 1995.
  31. Doubal FN, Dennis MS, Wardlaw JM. Characteristics of patients with minor ischaemic strokes and negative mri: A cross-sectional study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011;82:540-542
  32. van Leijsen EMC, van Uden IWM, Ghafoorian M, Bergkamp MI, Lohner V, Kooijmans ECM, van der Holst HM, Tuladhar AM, Norris DG, van Dijk EJ, Rutten-Jacobs LCA, Platel B, Klijn CJM, de Leeuw FE. Nonlinear temporal dynamics of cerebral small vessel disease: The run dmc study. *Neurology*. 2017;89:1569-1577
  33. Potter GM, Doubal FN, Jackson CA, Chappell FM, Sudlow CL, Dennis MS, Wardlaw JM. Counting cavitating lacunes underestimates the burden of lacunar infarction. *Stroke*. 2010;41:267-272
  34. Moreau F, Patel S, Lauzon ML, McCreary CR, Goyal M, Frayne R, Demchuk AM, Coutts SB, Smith EE. Cavitation after acute symptomatic lacunar stroke depends on time, location, and mri sequence. *Stroke*. 2012;43:1837-1842
  35. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MM, van der Lugt A. Incidental findings on brain mri in the general population. *The New England journal of medicine*. 2007;357:1821-1828
  36. Riba-Llena I, Montaner J, Delgado P. Letter by riba-llena et al regarding article, "not listened or not reported rather than silent stroke". *Stroke*. 2013;44:e42
  37. Hachinski VC, Potter P, Merskey H. Leuko-araiosis. *Archives of neurology*. 1987;44:21-23
  38. 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. American journal of roentgenology*. 1987;149:351-356
  39. Prins ND, Scheltens P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: An update. *Nature reviews. Neurology*. 2015;11:157-165

40. Wardlaw JM, Valdes Hernandez MC, Munoz-Maniega S. What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4:001140
41. Gouw AA, Seewann A, van der Flier WM, Barkhof F, Rozemuller AM, Scheltens P, Geurts JJ. Heterogeneity of small vessel disease: A systematic review of mri and histopathology correlations. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011;82:126-135
42. Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, Bronge L, Augustin M, Sjogren M, Wallin A, Ader H, Leys D, Pantoni L, Pasquier F, Erkinjuntti T, Scheltens P. A new rating scale for age-related white matter changes applicable to mri and ct. *Stroke*. 2001;32:1318-1322
43. Fazekas F, Kleinert R, Roob G, Kleinert G, Kapeller P, Schmidt R, Hartung HP. Histopathologic analysis of foci of signal loss on gradient-echo t2\*-weighted mr images in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: Evidence of microangiopathy-related microbleeds. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 1999;20:637-642
44. Greenberg SM, Vernooij MW, Cordonnier C, Viswanathan A, Al-Shahi Salman R, Warach S, Launer LJ, Van Buchem MA, Breteler MM. Cerebral microbleeds: A guide to detection and interpretation. *The Lancet. Neurology*. 2009;8:165-174
45. Caunca MR, De Leon-Benedetti A, Latour L, Leigh R, Wright CB. Neuroimaging of cerebral small vessel disease and age-related cognitive changes. *Frontiers in aging neuroscience*. 2019;11:145
46. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the boston criteria. *Neurology*. 2001;56:537-539
47. Jeerakathil T, Wolf PA, Beiser A, Hald JK, Au R, Kase CS, Massaro JM, DeCarli C. Cerebral microbleeds: Prevalence and associations with cardiovascular risk factors in the framingham study. *Stroke*. 2004;35:1831-1835
48. Ding J, Sigurdsson S, Jonsson PV, Eiriksdottir G, Meirelles O, Kjartansson O, Lopez OL, van Buchem MA, Gudnason V, Launer LJ. Space and location of cerebral microbleeds, cognitive decline, and dementia in the community. *Neurology*. 2017;88:2089-2097
49. Duning T, Kloska S, Steinstrater O, Kugel H, Heindel W, Knecht S. Dehydration confounds the assessment of brain atrophy. *Neurology*. 2005;64:548-550

## Bibliografía

50. Jack CR, Jr. Alliance for aging research ad biomarkers work group: Structural mri. *Neurobiology of aging*. 2011;32 Suppl 1:S48-57
51. Black S, Gao F, Bilbao J. Understanding white matter disease: Imaging-pathological correlations in vascular cognitive impairment. *Stroke*. 2009;40:S48-52
52. Appelman AP, Exalto LG, van der Graaf Y, Biessels GJ, Mali WP, Geerlings MI. White matter lesions and brain atrophy: More than shared risk factors? A systematic review. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2009;28:227-242
53. Scheltens P, Launer LJ, Barkhof F, Weinstein HC, van Gool WA. Visual assessment of medial temporal lobe atrophy on magnetic resonance imaging: Interobserver reliability. *Journal of neurology*. 1995;242:557-560
54. Koedam EL, Lehmann M, van der Flier WM, Scheltens P, Pijnenburg YA, Fox N, Barkhof F, Wattjes MP. Visual assessment of posterior atrophy development of a mri rating scale. *European radiology*. 2011;21:2618-2625
55. Davies RR, Scahill VL, Graham A, Williams GB, Graham KS, Hodges JR. Development of an mri rating scale for multiple brain regions: Comparison with volumetrics and with voxel-based morphometry. *Neuroradiology*. 2009;51:491-503
56. Kwee RM, Kwee TC. Virchow-robin spaces at mr imaging. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2007;27:1071-1086
57. Groeschel S, Chong WK, Surtees R, Hanefeld F. Virchow-robin spaces on magnetic resonance images: Normative data, their dilatation, and a review of the literature. *Neuroradiology*. 2006;48:745-754
58. Potter GM, Chappell FM, Morris Z, Wardlaw JM. Cerebral perivascular spaces visible on magnetic resonance imaging: Development of a qualitative rating scale and its observer reliability. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2015;39:224-231
59. Ding J, Sigurethsson S, Jonsson PV, Eiriksdottir G, Charidimou A, Lopez OL, van Buchem MA, Guethnason V, Launer LJ. Large perivascular spaces visible on magnetic resonance imaging, cerebral small vessel disease progression, and risk of dementia: The age, gene/environment susceptibility-reykjavik study. *JAMA neurology*. 2017;74:1105-1112

60. Yao M, Zhu YC, Soumare A, Dufouil C, Mazoyer B, Tzourio C, Chabriat H. Hippocampal perivascular spaces are related to aging and blood pressure but not to cognition. *Neurobiology of aging*. 2014;35:2118-2125
61. MacLulich AM, Wardlaw JM, Ferguson KJ, Starr JM, Seckl JR, Deary IJ. Enlarged perivascular spaces are associated with cognitive function in healthy elderly men. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004;75:1519-1523
62. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *The Lancet. Neurology*. 2018;17:1016-1024
63. Debette S, Schilling S, Duperron MG, Larsson SC, Markus HS. Clinical significance of magnetic resonance imaging markers of vascular brain injury: A systematic review and meta-analysis. *JAMA neurology*. 2019;76:81-94
64. Hilal S, Tan CS, Adams HHH, Habes M, Mok V, Venketasubramanian N, Hofer E, Ikram MK, Abrigo J, Vernooij MW, Chen C, Hosten N, Volzke H, Grabe HJ, Schmidt R, Ikram MA. Enlarged perivascular spaces and cognition: A meta-analysis of 5 population-based studies. *Neurology*. 2018;91:e832-e842
65. Riba-Llena I, Nafria C, Mundet X, Lopez-Rueda A, Fernandez-Cortinas I, Jarca CI, Jimenez-Balado J, Domingo M, Tovar JL, Orfila F, Pujadas F, Alvarez-Sabin J, Maisterra O, Montaner J, Delgado P. Assessment of enlarged perivascular spaces and their relation to target organ damage and mild cognitive impairment in patients with hypertension. *European journal of neurology*. 2016;23:1044-1050
66. Riba-Llena I, Jimenez-Balado J, Castane X, Girona A, Lopez-Rueda A, Mundet X, Jarca CI, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Delgado P. Arterial stiffness is associated with basal ganglia enlarged perivascular spaces and cerebral small vessel disease load. *Stroke*. 2018;49:1279-1281
67. Charidimou A, Boulouis G, Pasi M, Auriel E, van Etten ES, Haley K, Ayres A, Schwab KM, Martinez-Ramirez S, Goldstein JN, Rosand J, Viswanathan A, Greenberg SM, Gurol ME. Mri-visible perivascular spaces in cerebral amyloid angiopathy and hypertensive arteriopathy. *Neurology*. 2017;88:1157-1164
68. Ramirez J, Berezuk C, McNeely AA, Scott CJ, Gao F, Black SE. Visible virchow-robin spaces on magnetic resonance imaging of alzheimer's disease patients and normal elderly from the sunnybrook dementia study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;43:415-424



## Bibliografie

69. Staals J, Makin SD, Doubal FN, Dennis MS, Wardlaw JM. Stroke subtype, vascular risk factors, and total mri brain small-vessel disease burden. *Neurology*. 2014;83:1228-1234
70. Adams HH, Cavalieri M, Verhaaren BF, Bos D, van der Lugt A, Enzinger C, Vernooij MW, Schmidt R, Ikram MA. Rating method for dilated virchow-robin spaces on magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2013;44:1732-1735
71. Gonzalez-Castro V, Valdes Hernandez MDC, Chappell FM, Armitage PA, Makin S, Wardlaw JM. Reliability of an automatic classifier for brain enlarged perivascular spaces burden and comparison with human performance. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2017;131:1465-1481
72. Dubost F, Yilmaz P, Adams H, Bortsova G, Ikram MA, Niessen W, Vernooij M, de Bruijne M. Enlarged perivascular spaces in brain mri: Automated quantification in four regions. *NeuroImage*. 2019;185:534-544
73. van Dijk EJ, Prins ND, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Progression of cerebral small vessel disease in relation to risk factors and cognitive consequences: Rotterdam scan study. *Stroke*. 2008;39:2712-2719
74. Kloppenborg RP, Nederkoorn PJ, Grool AM, Vincken KL, Mali WPTM, Vermeulen M, van der Graaf Y, Geerlings MI, Group SS. Cerebral small-vessel disease and progression of brain atrophy: The smart-mr study. *Neurology*. 2012;79:2029-2036
75. van Sloten TT, Sigurdsson S, van Buchem MA, Phillips CL, Jonsson PV, Ding J, Schram MT, Harris TB, Gudnason V, Launer LJ. Cerebral small vessel disease and association with higher incidence of depressive symptoms in a general elderly population: The ages-reykjavik study. *The American journal of psychiatry*. 2015;172:570-578
76. Maillard P, Crivello F, Dufouil C, Tzourio-Mazoyer N, Tzourio C, Mazoyer B. Longitudinal follow-up of individual white matter hyperintensities in a large cohort of elderly. *Neuroradiology*. 2009;51:209-220
77. Gottesman RF, Coresh J, Catellier DJ, Sharrett AR, Rose KM, Coker LH, Shibata DK, Knopman DS, Jack CR, Mosley TH, Jr. Blood pressure and white-matter disease progression in a biethnic cohort: Atherosclerosis risk in communities (aric) study. *Stroke*. 2010;41:3-8

78. Prins ND, van Straaten EC, van Dijk EJ, Simoni M, van Schijndel RA, Vrooman HA, Koudstaal PJ, Scheltens P, Breteler MM, Barkhof F. Measuring progression of cerebral white matter lesions on mri: Visual rating and volumetrics. *Neurology*. 2004;62:1533-1539
79. van Leijsen EMC, de Leeuw F-E, Tuladhar AM. Disease progression and regression in sporadic small vessel disease-insights from neuroimaging. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2017;131:1191-1206
80. Schmidt R, Enzinger C, Ropele S, Schmidt H, Fazekas F, Austrian Stroke Prevention S. Progression of cerebral white matter lesions: 6-year results of the austrian stroke prevention study. *Lancet (London, England)*. 2003;361:2046-2048
81. Maillard P, Fletcher E, Harvey D, Carmichael O, Reed B, Mungas D, DeCarli C. White matter hyperintensity penumbra. *Stroke*. 2011;42:1917-1922
82. Croall ID, Lohner V, Moynihan B, Khan U, Hassan A, O'Brien JT, Morris RG, Tozer DJ, Cambridge VC, Harkness K, Werring DJ, Blamire AM, Ford GA, Barrick TR, Markus HS. Using dti to assess white matter microstructure in cerebral small vessel disease (svd) in multicentre studies. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2017;131:1361-1373
83. Baykara E, Gesierich B, Adam R, Tuladhar AM, Biesbroek JM, Koek HL, Ropele S, Jouvent E, Chabriat H, Ertl-Wagner B, Ewers M, Schmidt R, de Leeuw FE, Biessels GJ, Dichgans M, Duering M. A novel imaging marker for small vessel disease based on skeletonization of white matter tracts and diffusion histograms. *Annals of neurology*. 2016;80:581-592
84. Wardlaw JM, Chappell FM, Valdes Hernandez MDC, Makin SDJ, Staals J, Shuler K, Thrippleton MJ, Armitage PA, Munoz-Maniega S, Heye AK, Sakka E, Dennis MS. White matter hyperintensity reduction and outcomes after minor stroke. *Neurology*. 2017;89:1003-1010
85. Moore MN, Atkins ER, Salam A, Callisaya ML, Hare JL, Marwick TH, Nelson MR, Wright L, Sharman JE, Rodgers A. Regression to the mean of repeated ambulatory blood pressure monitoring in five studies. *Journal of hypertension*. 2019;37:24-29
86. Jokinen H, Gouw AA, Madureira S, Ylikoski R, van Straaten EC, van der Flier WM, Barkhof F, Scheltens P, Fazekas F, Schmidt R, Verdelho A, Ferro JM, Pantoni L, Inzitari D, Erkinjuntti T. Incident lacunes influence cognitive decline: The ladis study. *Neurology*. 2011;76:1872-1878

## Bibliografía

87. Benjamin P, Zeestraten E, Lambert C, Ster IC, Williams OA, Lawrence AJ, Patel B, MacKinnon AD, Barrick TR, Markus HS. Progression of mri markers in cerebral small vessel disease: Sample size considerations for clinical trials. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36:228-240
88. Longstreth WT, Jr., Dulberg C, Manolio TA, Lewis MR, Beauchamp NJ, Jr., O'Leary D, Carr J, Furberg CD. Incidence, manifestations, and predictors of brain infarcts defined by serial cranial magnetic resonance imaging in the elderly: The cardiovascular health study. *Stroke*. 2002;33:2376-2382
89. Vermeer SE, Den Heijer T, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Incidence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based rotterdam scan study. *Stroke*. 2003;34:392-396
90. Vermeer SE, Longstreth WT, Jr., Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: A systematic review. *The Lancet. Neurology*. 2007;6:611-619
91. Gouw AA, van der Flier WM, Pantoni L, Inzitari D, Erkinjuntti T, Wahlund LO, Waldemar G, Schmidt R, Fazekas F, Scheltens P, Barkhof F, group Ls. On the etiology of incident brain lacunes: Longitudinal observations from the ladis study. *Stroke*. 2008;39:3083-3085
92. Loos CMJ, Staals J, Wardlaw JM, van Oostenbrugge RJ. Cavitation of deep lacunar infarcts in patients with first-ever lacunar stroke: A 2-year follow-up study with mr. *Stroke*. 2012;43:2245-2247
93. Poels MM, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman A, Krestin GP, Breteler MM, Vernooij MW. Incidence of cerebral microbleeds in the general population: The rotterdam scan study. *Stroke*. 2011;42:656-661
94. Ding J, Sigurdsson S, Garcia M, Phillips CL, Eiriksdottir G, Gudnason V, van Buchem MA, Launer LJ. Risk factors associated with incident cerebral microbleeds according to location in older people: The age, gene/environment susceptibility (ages)-reykjavik study. *JAMA neurology*. 2015;72:682-688
95. Lee S-H, Lee S-T, Kim BJ, Park H-K, Kim C-K, Jung K-H, Roh J-K. Dynamic temporal change of cerebral microbleeds: Long-term follow-up mri study. *PloS one*. 2011;6:e25930-e25930

96. Akoudad S, Portegies MLP, Koudstaal PJ, Hofman A, van der Lugt A, Ikram MA, Vernooij MW. Cerebral microbleeds are associated with an increased risk of stroke: The rotterdam study. *Circulation*. 2015;132:509-516
97. Poels MMF, Vernooij MW, Ikram MA, Hofman A, Krestin GP, van der Lugt A, Breteler MMB. Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: An update of the rotterdam scan study. *Stroke*. 2010;41:S103-S106
98. Cheung N, Mosley T, Islam A, Kawasaki R, Sharrett AR, Klein R, Coker LH, Knopman DS, Shibata DK, Catellier D, Wong TY. Retinal microvascular abnormalities and subclinical magnetic resonance imaging brain infarct: A prospective study. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133:1987-1993
99. Debette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, Wolf PA, DeCarli C. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology*. 2011;77:461-468
100. Longstreth WT, Jr., Arnold AM, Beauchamp NJ, Jr., Manolio TA, Lefkowitz D, Jungreis C, Hirsch CH, O'Leary DH, Furberg CD. Incidence, manifestations, and predictors of worsening white matter on serial cranial magnetic resonance imaging in the elderly: The cardiovascular health study. *Stroke*. 2005;36:56-61
101. Uiterwijk R, Staals J, Huijts M, de Leeuw PW, Kroon AA, van Oostenbrugge RJ. Mri progression of cerebral small vessel disease and cognitive decline in patients with hypertension. *Journal of hypertension*. 2017;35:1263-1270
102. Schmidt R, Berghold A, Jokinen H, Gouw AA, van der Flier WM, Barkhof F, Scheltens P, Petrovic K, Madureira S, Verdelho A, Ferro JM, Waldemar G, Wallin A, Wahlund LO, Poggesi A, Pantoni L, Inzitari D, Fazekas F, Erkinjuntti T. White matter lesion progression in ladis: Frequency, clinical effects, and sample size calculations. *Stroke*. 2012;43:2643-2647
103. Liu W, Liu R, Sun W, Peng Q, Zhang W, Xu E, Cheng Y, Ding M, Li Y, Hong Z, Wu J, Zeng J, Yao C, Huang Y, Group CS. Different impacts of blood pressure variability on the progression of cerebral microbleeds and white matter lesions. *Stroke*. 2012;43:2916-2922
104. Lo RY, Jagust WJ. Vascular burden and alzheimer disease pathologic progression. *Neurology*. 2012;79:1349-1355

## Bibliografía

105. Menendez E, Delgado E, Fernandez-Vega F, Prieto MA, Bordiu E, Calle A, Carmena R, Castano L, Catala M, Franch J, Gaztambide S, Girbes J, Goday A, Gomis R, Lopez-Alba A, Martinez-Larrad MT, Mora-Peces I, Ortega E, Rojo-Martinez G, Serrano-Rios M, Urrutia I, Valdes S, Vazquez JA, Vendrell J, Soriguer F. Prevalence, diagnosis, treatment, and control of hypertension in Spain. Results of the di@bet.Es study. *Revista española de cardiología (English ed.)*. 2016;69:572-578
106. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC, Jr., Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA, Sr., Williamson JD, Wright JT, Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APHA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: Executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2018;138:e426-e483
107. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. *European heart journal*. 2018;39:3021-3104
108. Vermeer SE, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke*. 2002;33:21-25
109. Friedman JI, Tang CY, de Haas HJ, Changchien L, Goliash G, Dabas P, Wang V, Fayad ZA, Fuster V, Narula J. Brain imaging changes associated with risk factors for cardiovascular and cerebrovascular disease in asymptomatic patients. *JACC. Cardiovascular imaging*. 2014;7:1039-1053
110. Lyu L, Shen J, Zeng C, Ji J, Hu W, Wei T, Mao W. Cerebral microbleeds are associated with blood pressure levels in individuals with hypertension. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)*. 2019:1-7

111. 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
112. Del Brutto OH, Mera RM. Neuroimaging signatures of cerebral small vessel disease at blood pressure cutoff levels of 130/80 and 140/90 mmhg: A population-based study in community-dwellers aged  $\geq 60$  years. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*. 2018;25:203-208
113. Nam KW, Kwon HM, Jeong HY, Park JH, Kwon H, Jeong SM. Cerebral small vessel disease and stage 1 hypertension defined by the 2017 american college of cardiology/american heart association guidelines. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2019;73:1210-1216
114. White WB, Marfatia R, Schmidt J, Wakefield DB, Kaplan RF, Bohannon RW, Hall CB, Guttmann CR, Moscufo N, Fellows D, Wolfson L. Intensive versus standard ambulatory blood pressure lowering to prevent functional decline in the elderly (infinity). *American heart journal*. 2013;165:258-265.e251
115. Punzi HA. Why ambulatory blood pressure monitoring? *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 1998;55 Suppl 3:S12-16
116. Klarenbeek P, van Oostenbrugge RJ, Rouhl RP, Knottnerus IL, Staals J. Ambulatory blood pressure in patients with lacunar stroke: Association with total mri burden of cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2013;44:2995-2999
117. White WB, Wolfson L, Wakefield DB, Hall CB, Campbell P, Moscufo N, Schmidt J, Kaplan RF, Pearlson G, Guttmann CR. Average daily blood pressure, not office blood pressure, is associated with progression of cerebrovascular disease and cognitive decline in older people. *Circulation*. 2011;124:2312-2319
118. Filomena J, Riba-Llena I, Vinyoles E, Tovar JL, Mundet X, Castane X, Vilar A, Lopez-Rueda A, Jimenez-Balado J, Cartanya A, Montaner J, Delgado P. Short-term blood pressure variability relates to the presence of subclinical brain small vessel disease in primary hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2015;66:634-640; discussion 445
119. van Middelaar T, Richard E, Moll van Charante EP, van Gool WA, van Dalen J-W. Visit-to-visit blood pressure variability and progression of white matter hyperintensities among

- older people with hypertension. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2019;20:1175-1177.e1171
120. Toyoda K, Ninomiya T. Stroke and cerebrovascular diseases in patients with chronic kidney disease. *The Lancet. Neurology*. 2014;13:823-833
121. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *Lancet (London, England)*. 2013;382:260-272
122. Vilar-Bergua A, Riba-Llena I, Ramos N, Mundet X, Espinel E, Lopez-Rueda A, Ostos E, Seron D, Montaner J, Delgado P. Microalbuminuria and the combination of mri markers of cerebral small vessel disease. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2016;42:66-72
123. Tsai YH, Lee M, Lin LC, Chang SW, Weng HH, Yang JT, Huang YC, Lee MH. Association of chronic kidney disease with small vessel disease in patients with hypertensive intracerebral hemorrhage. *Frontiers in neurology*. 2018;9:284
124. Ikram MA, Vernooij MW, Hofman A, Niessen WJ, van der Lugt A, Breteler MM. Kidney function is related to cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2008;39:55-61
125. Georgakis MK, Chatzopoulou D, Tsivgoulis G, Petridou ET. Albuminuria and cerebral small vessel disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2018
126. Sedaghat S, Ding J, Eiriksdottir G, van Buchem MA, Sigurdsson S, Ikram MA, Meirelles O, Gudnason V, Levey AS, Launer LJ. The ages-reykjavik study suggests that change in kidney measures is associated with subclinical brain pathology in older community-dwelling persons. *Kidney international*. 2018
127. Auriel E, Kliper E, Shenhar-Tsarfaty S, Molad J, Berliner S, Shapira I, Ben-Bashat D, Shopin L, Tene O, Rosenberg GA, Bornstein NM, Ben Assayag E. Impaired renal function is associated with brain atrophy and poststroke cognitive decline. *Neurology*. 2016;86:1996-2005
128. Valdes S, Garcia-Torres F, Maldonado-Araque C, Goday A, Calle-Pascual A, Soriguer F, Castano L, Catala M, Gomis R, Rojo-Martinez G. Prevalence of obesity, diabetes and other cardiovascular risk factors in andalusia (southern spain). Comparison with national

- prevalence data. The di@bet.Es study. *Revista española de cardiología (English ed.)*. 2014;67:442-448
129. Schmidt R, Launer LJ, Nilsson LG, Pajak A, Sans S, Berger K, Breteler MM, de Ridder M, Dufouil C, Fuhrer R, Giampaoli S, Hofman A. Magnetic resonance imaging of the brain in diabetes: The cardiovascular determinants of dementia (cascade) study. *Diabetes*. 2004;53:687-692
130. Fanning JP, Wong AA, Fraser JF. The epidemiology of silent brain infarction: A systematic review of population-based cohorts. *BMC medicine*. 2014;12:119
131. Whalley LJ, Staff RT, Murray AD, Duthie SJ, Collins AR, Lemmon HA, Starr JM, Deary IJ. Plasma vitamin c, cholesterol and homocysteine are associated with grey matter volume determined by mri in non-demented old people. *Neuroscience letters*. 2003;341:173-176
132. Lee J, Sohn EH. Characteristics of cerebral microbleeds. 2018;17:73-82
133. Yubi T, Hata J, Ohara T, Mukai N, Hirakawa Y, Yoshida D, Gotoh S, Hirabayashi N, Furuta Y, Ago T, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Prevalence of and risk factors for cerebral microbleeds in a general japanese elderly community. *Neurology. Clinical practice*. 2018;8:223-231
134. Debette S, Beiser A, Hoffmann U, Decarli C, O'Donnell CJ, Massaro JM, Au R, Himali JJ, Wolf PA, Fox CS, Seshadri S. Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults. *Annals of neurology*. 2010;68:136-144
135. Paul RH, Grieve SM, Niaura R, David SP, Laidlaw DH, Cohen R, Sweet L, Taylor G, Clark RC, Pogun S, Gordon E. Chronic cigarette smoking and the microstructural integrity of white matter in healthy adults: A diffusion tensor imaging study. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*. 2008;10:137-147
136. Kwon HM, Kim BJ, Park JH, Ryu WS, Kim CK, Lee SH, Ko SB, Nam H, Lee SH, Lee YS, Yoon BW. Significant association of metabolic syndrome with silent brain infarction in elderly people. *Journal of neurology*. 2009;256:1825-1831



## Bibliografía

137. Choi HS, Cho YM, Kang JH, Shin CS, Park KS, Lee HK. Cerebral white matter hyperintensity is mainly associated with hypertension among the components of metabolic syndrome in Koreans. *Clinical endocrinology*. 2009;71:184-188
138. Gardener H, Scarmeas N, Gu Y, Boden-Albala B, Elkind MS, Sacco RL, DeCarli C, Wright CB. Mediterranean diet and white matter hyperintensity volume in the northern Manhattan study. *Archives of neurology*. 2012;69:251-256
139. Gons RA, Tuladhar AM, de Laat KF, van Norden AG, van Dijk EJ, Norris DG, Zwiers MP, de Leeuw FE. Physical activity is related to the structural integrity of cerebral white matter. *Neurology*. 2013;81:971-976
140. Turner ST, Jack CR, Fornage M, Mosley TH, Boerwinkle E, de Andrade M. Heritability of leukoaraiosis in hypertensive sibships. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. 2004;43:483-487
141. Atwood LD, Wolf PA, Heard-Costa NL, Massaro JM, Beiser A, D'Agostino RB, DeCarli C. Genetic variation in white matter hyperintensity volume in the Framingham study. *Stroke*. 2004;35:1609-1613
142. Ten Kate M, Sudre CH, den Braber A, Konijnenberg E, Nivard MG, Cardoso MJ, Scheltens P, Ourselin S, Boomsma DI, Barkhof F, Visser PJ. White matter hyperintensities and vascular risk factors in monozygotic twins. *Neurobiology of aging*. 2018;66:40-48
143. Schmidt H, Zeginigg M, Wiltgen M, Freudenberger P, Petrovic K, Cavalieri M, Gider P, Enzinger C, Fornage M, Debette S, Rotter JI, Ikram MA, Launer LJ, Schmidt R, group CcNw. Genetic variants of the notch3 gene in the elderly and magnetic resonance imaging correlates of age-related cerebral small vessel disease. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134:3384-3397
144. Fornage M, Debette S, Bis JC, Schmidt H, Ikram MA, Dufouil C, Sigurdsson S, Lumley T, DeStefano AL, Fazekas F, Vrooman HA, Shibata DK, Maillard P, Zijdenbos A, Smith AV, Gudnason H, de Boer R, Cushman M, Mazoyer B, Heiss G, Vernooij MW, Enzinger C, Glazer NL, Beiser A, Knopman DS, Cavalieri M, Niessen WJ, Harris TB, Petrovic K, Lopez OL, Au R, Lambert J-C, Hofman A, Gottesman RF, Garcia M, Heckbert SR, Atwood LD, Catellier DJ, Uitterlinden AG, Yang Q, Smith NL, Aspelund T, Romero JR, Rice K, Taylor KD, Nalls MA, Rotter JI, Sharrett R, van Duijn CM, Amouyel P, Wolf PA, Gudnason V, van der Lugt A, Boerwinkle E, Psaty BM, Seshadri S, Tzourio C, Breteler MMB, Mosley TH,

- Schmidt R, Longstreth WT, DeCarli C, Launer LJ. Genome-wide association studies of cerebral white matter lesion burden: The charge consortium. *Annals of neurology*. 2011;69:928-939
145. Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2012;110:49-55
146. Poggesi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: A review. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36:72-94
147. 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;977:306-314
148. Kloppenborg RP, Geerlings MI, Visseren FL, Mali WP, Vermeulen M, van der Graaf Y, Nederkoorn PJ. Homocysteine and progression of generalized small-vessel disease: The smart-mr study. *Neurology*. 2014;82:777-783
149. Farrall AJ, Wardlaw JM. Blood-brain barrier: Ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of aging*. 2009;30:337-352
150. Wardlaw JM, Doubal FN, Valdes-Hernandez M, Wang X, Chappell FM, Shuler K, Armitage PA, Carpenter TC, Dennis MS. Blood-brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2013;44:525-527
151. Kim Y, Kim YK, Kim NK, Kim SH, Kim OJ, Oh SH. Circulating matrix metalloproteinase-9 level is associated with cerebral white matter hyperintensities in non-stroke individuals. *European neurology*. 2014;72:234-240
152. 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. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36:55-71

## Bibliografía

153. 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
154. van Dijk EJ, Prins ND, Vermeer SE, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. C-reactive protein and cerebral small-vessel disease: The rotterdam scan study. *Circulation*. 2005;112:900-905
155. Schilling S, Tzourio C, Dufouil C, Zhu Y, Berr C, Alperovitch A, Crivello F, Mazoyer B, Debette S. Plasma lipids and cerebral small vessel disease. *Neurology*. 2014;83:1844-1852
156. Nagai M, Hoshida S, Kario K. Association of prothrombotic status with markers of cerebral small vessel disease in elderly hypertensive patients. *American journal of hypertension*. 2012;25:1088-1094
157. Gupta A, Giambone AE, Gialdini G, Finn C, Delgado D, Gutierrez J, Wright C, Beiser AS, Seshadri S, Pandya A, Kamel H. Silent brain infarction and risk of future stroke: A systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2016;47:719-725
158. Kuller LH, Longstreth WT, Jr., Arnold AM, Bernick C, Bryan RN, Beauchamp NJ, Jr. White matter hyperintensity on cranial magnetic resonance imaging: A predictor of stroke. *Stroke*. 2004;35:1821-1825
159. Buyck JF, Dufouil C, Mazoyer B, Maillard P, Ducimetiere P, Alperovitch A, Bousser MG, Kurth T, Tzourio C. Cerebral white matter lesions are associated with the risk of stroke but not with other vascular events: The 3-city dijon study. *Stroke*. 2009;40:2327-2331
160. Leung LY, Han PKJ, Lundquist C, Weinstein G, Thaler DE, Kent DM. Clinicians' perspectives on incidentally discovered silent brain infarcts - a qualitative study. *PloS one*. 2018;13:e0194971
161. Inzitari D, Cadelo M, Marranci ML, Pracucci G, Pantoni L. Vascular deaths in elderly neurological patients with leukoaraiosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1997;62:177-181
162. Gerdes VE, Kwa VI, ten Cate H, Brandjes DP, Buller HR, Stam J. Cerebral white matter lesions predict both ischemic strokes and myocardial infarctions in patients with established atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 2006;186:166-172

163. Marrugat J, Subirana I, Comin E, Cabezas C, Vila J, Elosua R, Nam BH, Ramos R, Sala J, Solanas P, Cordon F, Gene-Badia J, D'Agostino RB. Validity of an adaptation of the framingham cardiovascular risk function: The verifica study. *Journal of epidemiology and community health*. 2007;61:40-47
164. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F, Redon J, Dominiczak A, Narkiewicz K, Nilsson PM, Burnier M, Viigimaa M, Ambrosioni E, Caulfield M, Coca A, Olsen MH, Schmieder RE, Tsioufis C, van de Borne P, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Clement DL, Coca A, Gillebert TC, Tendera M, Rosei EA, Ambrosioni E, Anker SD, Bauersachs J, Hitij JB, Caulfield M, De Buyzere M, De Geest S, Derumeaux GA, Erdine S, Farsang C, Funck-Brentano C, Gerc V, Germano G, Gielen S, Haller H, Hoes AW, Jordan J, Kahan T, Komajda M, Lovic D, Mahrholdt H, Olsen MH, Ostergren J, Parati G, Perk J, Polonia J, Popescu BA, Reiner Z, Rydén L, Sirenko Y, Stanton A, Struijker-Boudier H, Tsioufis C, van de Borne P, Vlachopoulos C, Volpe M, Wood DA. 2013 esh/esc 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). *European heart journal*. 2013;34:2159-2219
165. Salud OMdl. Demencia. 2019;2019
166. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Prevalence of dementia and major subtypes in europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology*. 2000;54:S4-9
167. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L, Gannon B, Jones DH, Jennum P, Jordanova A, Jonsson L, Karampampa K, Knapp M, Kobelt G, Kurth T, Lieb R, Linde M, Ljungcrantz C, Maercker A, Melin B, Moscarelli M, Musayev A, Norwood F, Preisig M, Pugliatti M, Rehm J, Salvador-Carulla L, Schlehofer B, Simon R, Steinhausen HC, Stovner LJ, Vallat JM, Van den Bergh P, van Os J, Vos P, Xu W, Wittchen HU, Jonsson B, Olesen J. Cost of disorders of the brain

- in europe 2010. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2011;21:718-779
168. Getsios D, Migliaccio-Walle K, Caro JJ. Nice cost-effectiveness appraisal of cholinesterase inhibitors: Was the right question posed? Were the best tools used? *Pharmacoeconomics*. 2007;25:997-1006
169. Grau-Olivares M, Bartres-Faz D, Arboix A, Soliva JC, Rovira M, Targa C, Junque C. Mild cognitive impairment after lacunar infarction: Voxel-based morphometry and neuropsychological assessment. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2007;23:353-361
170. Boyle PA, Yu L, Fleischman DA, Leurgans S, Yang J, Wilson RS, Schneider JA, Arvanitakis Z, Arfanakis K, Bennett DA. White matter hyperintensities, incident mild cognitive impairment, and cognitive decline in old age. *Annals of clinical and translational neurology*. 2016;3:791-800
171. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, Launer LJ, Laurent S, Lopez OL, Nyenhuis D, Petersen RC, Schneider JA, Tzourio C, Arnett DK, Bennett DA, Chui HC, Higashida RT, Lindquist R, Nilsson PM, Roman GC, Sellke FW, Seshadri S. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*. 2011;42:2672-2713
172. Skrobot OA, Black SE, Chen C, DeCarli C, Erkinjuntti T, Ford GA, Kalaria RN, O'Brien J, Pantoni L, Pasquier F, Roman GC, Wallin A, Sachdev P, Skoog I, Ben-Shlomo Y, Passmore AP, Love S, Kehoe PG. Progress toward standardized diagnosis of vascular cognitive impairment: Guidelines from the vascular impairment of cognition classification consensus study. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2018;14:280-292
173. Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, et al. Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies. Report of the ninds-airen international workshop. *Neurology*. 1993;43:250-260
174. Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1862:915-925

175. Chen X, Duan L, Han Y, Tian L, Dai Q, Wang S, Lin Y, Xiong Y, Liu X. Predictors for vascular cognitive impairment in stroke patients. *BMC neurology*. 2016;16:115
176. Pohjasvaara T, Mantyla R, Salonen O, Aronen HJ, Ylikoski R, Hietanen M, Kaste M, Erkinjuntti T. How complex interactions of ischemic brain infarcts, white matter lesions, and atrophy relate to poststroke dementia. *Archives of neurology*. 2000;57:1295-1300
177. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007;69:2197-2204
178. Prins ND, van Dijk EJ, den Heijer T, Vermeer SE, Jolles J, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Cerebral small-vessel disease and decline in information processing speed, executive function and memory. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128:2034-2041
179. van den Heuvel DM, ten Dam VH, de Craen AJ, Admiraal-Behloul F, Olofsen H, Bollen EL, Jolles J, Murray HM, Blauw GJ, Westendorp RG, van Buchem MA. Increase in periventricular white matter hyperintensities parallels decline in mental processing speed in a non-demented elderly population. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2006;77:149-153
180. DeCarli C, Mungas D, Harvey D, Reed B, Weiner M, Chui H, Jagust W. Memory impairment, but not cerebrovascular disease, predicts progression of mci to dementia. *Neurology*. 2004;63:220-227
181. Bonelli RM, Cummings JL. Frontal-subcortical circuitry and behavior. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2007;9:141-151
182. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. *Archives of neurology*. 1999;56:303-308
183. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, Nordberg A, Backman L, Albert M, Almkvist O, Arai H, Basun H, Blennow K, de Leon M, DeCarli C, Erkinjuntti T, Giacobini E, Graff C, Hardy J, Jack C, Jorm A, Ritchie K, van Duijn C, Visser P, Petersen RC. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: Report of the international working group on mild cognitive impairment. *Journal of internal medicine*. 2004;256:240-246

## Bibliografía

184. Petersen RC. Mild cognitive impairment. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. 2016;22:404-418
185. Petersen RC. Clinical practice. Mild cognitive impairment. *The New England journal of medicine*. 2011;364:2227-2234
186. Eshkoor SA, Hamid TA, Mun CY, Ng CK. Mild cognitive impairment and its management in older people. *Clinical interventions in aging*. 2015;10:687-693
187. Tricco AC, Soobiah C, Lillie E, Perrier L, Chen MH, Hemmelgarn B, Majumdar SR, Straus SE. Use of cognitive enhancers for mild cognitive impairment: Protocol for a systematic review and network meta-analysis. *Systematic reviews*. 2012;1:25
188. Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Vonsattel JP, Mayeux R. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Annals of neurology*. 2008;63:494-506
189. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, Roman G, Sawada T, Pantoni L, Bowler JV, Ballard C, DeCarli C, Gorelick PB, Rockwood K, Burns A, Gauthier S, DeKosky ST. Vascular cognitive impairment. *The Lancet. Neurology*. 2003;2:89-98
190. Sachdev PS, Wen W, Christensen H, Jorm AF. White matter hyperintensities are related to physical disability and poor motor function. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005;76:362-367
191. Marnane M, Al-Jawadi OO, Mortazavi S, Pogorzelec KJ, Wang BW, Feldman HH, Hsiung GY. Periventricular hyperintensities are associated with elevated cerebral amyloid. *Neurology*. 2016;86:535-543
192. Bangen KJ, Preis SR, Delano-Wood L, Wolf PA, Libon DJ, Bondi MW, Au R, DeCarli C, Brickman AM. Baseline white matter hyperintensities and hippocampal volume are associated with conversion from normal cognition to mild cognitive impairment in the framingham offspring study. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2017
193. 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 neurology*. 2013;13:130

194. Jurica PL, CL; Mattis, S. *Dementia rating scale-2*. Professional Florida: Psychological Assessment Resources Inc.; 2001.
195. Riba-Llena I, Nafria C, Giralt D, Fernandez-Cortinas I, Jarca CI, Mundet X, Tovar JL, Orfila F, Castane X, Alvarez-Sabin J, Maisterra O, Montaner J, Delgado P. Dementia rating scale-2 normative data for middle-and older-aged castilian speaking spaniards. *The Clinical neuropsychologist*. 2016;30:1443-1456
196. Conde V, Escribá JA, Izquierdo JA. Statistic evaluation and spanish adaptation of zung's self-applied scale for depression. li. *Arch Neurobiol (Madr)*. 1970;33:281-302
197. Böhm P, Peña-Casanova J, Aguilar M, Hernández G, Sol JM, Blesa R. Clinical validity and utility of the interview for deterioration of daily living in dementia for spanish-speaking communities normacodem group. *International psychogeriatrics*. 1998;10:261-270
198. Riba I, Jarca CI, Mundet X, Tovar JL, Orfila F, Nafria C, Raga A, Girona A, Fernandez-Lara P, Castane X, Alvarez Sabin J, Fernandez Cortinas I, Maisterra O, Montaner J, Delgado P. Cognitive assessment protocol design in the issys (investigating silent strokes in hypertensives: A magnetic resonance imaging study). *Journal of the neurological sciences*. 2012;322:79-81
199. Espinosa A, Alegret M, Valero S, Vinyes-Junque G, Hernandez I, Mauleon A, Rosende-Roca M, Ruiz A, Lopez O, Tarraga L, Boada M. A longitudinal follow-up of 550 mild cognitive impairment patients: Evidence for large conversion to dementia rates and detection of major risk factors involved. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;34:769-780
200. O'Brien E, Petrie J, Littler W, de Swiet M, Padfield PL, O'Malley K, Jamieson M, Altman D, Bland M, Atkins N. The british hypertension society protocol for the evaluation of automated and semi-automated blood pressure measuring devices with special reference to ambulatory systems. *Journal of hypertension*. 1990;8:607-619
201. Cordonnier C, Potter GM, Jackson CA, Doubal F, Keir S, Sudlow CL, Wardlaw JM, Al-Shahi Salman R. Improving interrater agreement about brain microbleeds: Development of the brain observer microbleed scale (bombs). *Stroke*. 2009;40:94-99
202. Ni X, Castanares M, Mukherjee A, Lupold SE. Nucleic acid aptamers: Clinical applications and promising new horizons. *Curr Med Chem*. 2011;18:4206-4214



## Bibliografia

203. Rohloff JC, Gelinás AD, Jarvis TC, Ochsner UA, Schneider DJ, Gold L, Janjic N. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Molecular therapy. Nucleic acids*. 2014;3:e201
204. Candia J, Cheung F, Kotliarov Y, Fantoni G, Sellers B, Griesman T, Huang J, Stuccio S, Zingone A, Ryan BM. Assessment of variability in the somascan assay. 2017;7:14248
205. Konstantinou GN. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). *Methods Mol Biol*. 2017;1592:79-94
206. Charidimou A, Meegahage R, Fox Z, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, Baron J-C, Jäger HR, Werring DJ. Enlarged perivascular spaces as a marker of underlying arteriopathy in intracerebral haemorrhage: A multicentre mri cohort study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013;84:624-629
207. Canevelli M, Grande G, Lacorte E, Quarchioni E, Cesari M, Mariani C, Bruno G, Vanacore N. Spontaneous reversion of mild cognitive impairment to normal cognition: A systematic review of literature and meta-analysis. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2016;17:943-948
208. Roberts RO, Knopman DS, Mielke MM, Cha RH, Pankratz VS, Christianson TJ, Geda YE, Boeve BF, Ivnik RJ, Tangalos EG, Rocca WA, Petersen RC. Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal. *Neurology*. 2014;82:317-325
209. Jang AR, Yoon JY. Factors affecting reversion from mild cognitive impairment to normal cognition in midlife to later life in korea: A national population study. *Geriatrics & gerontology international*. 2019;19:1129-1135
210. Facal D, Guàrdia-Olmos J, Juncos-Rabadán O. Diagnostic transitions in mild cognitive impairment by use of simple markov models. *International journal of geriatric psychiatry*. 2015;30:669-676
211. Mortamais M, Artero S, Ritchie K. Cerebral white matter hyperintensities in the prediction of cognitive decline and incident dementia. *International review of psychiatry (Abingdon, England)*. 2013;25:686-698

212. Akoudad S, Wolters FJ, Viswanathan A, de Bruijn RF, van der Lugt A, Hofman A, Koudstaal PJ, Ikram MA, Vernooij MW. Association of cerebral microbleeds with cognitive decline and dementia. *JAMA neurology*. 2016;73:934-943
213. Charidimou A, Shams S, Romero JR, Ding J, Veltkamp R, Horstmann S, Eiriksdottir G, van Buchem MA, Gudnason V, Himali JJ, Gurol ME, Viswanathan A, Imaizumi T, Vernooij MW, Seshadri S, Greenberg SM, Benavente OR, Launer LJ, Shoamanesh A. Clinical significance of cerebral microbleeds on mri: A comprehensive meta-analysis of risk of intracerebral hemorrhage, ischemic stroke, mortality, and dementia in cohort studies (v1). *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2018:1747493017751931
214. Kim S, Choi SH, Lee YM, Kim MJ, Kim YD, Kim JY, Park JH, Myung W, Na HR, Han HJ, Shim YS, Kim JH, Yoon SJ, Kim SY, Kim DK. Periventricular white matter hyperintensities and the risk of dementia: A credos study. *International psychogeriatrics*. 2015;27:2069-2077
215. Dhamoon MS, Cheung Y-K, Bagci A, Alperin N, Sacco RL, Elkind MSV, Wright CB. Periventricular white matter hyperintensities and functional decline. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2018;66:113-119
216. Filley CM. The behavioral neurology of cerebral white matter. *Neurology*. 1998;50:1535-1540
217. De Groot JC, De Leeuw FE, Oudkerk M, Van Gijn J, Hofman A, Jolles J, Breteler MM. Periventricular cerebral white matter lesions predict rate of cognitive decline. *Annals of neurology*. 2002;52:335-341
218. Liu Q, Zhu Z, Teipel SJ, Yang J, Xing Y, Tang Y, Jia J. White matter damage in the cholinergic system contributes to cognitive impairment in subcortical vascular cognitive impairment, no dementia. *Frontiers in aging neuroscience*. 2017;9:47
219. Park H-E, Park I-S, Oh Y-S, Yang D-W, Lee K-S, Choi H-S, Ahn K-J, Kim J-S. Subcortical whiter matter hyperintensities within the cholinergic pathways of patients with dementia and parkinsonism. *Journal of the neurological sciences*. 2015;353:44-48
220. DeCarli C, Fletcher E, Ramey V, Harvey D, Jagust WJ. Anatomical mapping of white matter hyperintensities (wmh): Exploring the relationships between periventricular wmh, deep wmh, and total wmh burden. *Stroke*. 2005;36:50-55

221. Kario K. Preface: "The lower the better" association between white-coat effect-excluded blood pressure and cardiovascular events in high-risk hypertension: Insights from sprint. *Curr Hypertens Rev.* 2016;12:2-10
222. Group SMIftSR, Nasrallah IM, Pajewski NM, Auchus AP, Chelune G, Cheung AK, Cleveland ML, Coker LH, Crowe MG, Cushman WC, Cutler JA, Davatzikos C, Desiderio L, Doshi J, Erus G, Fine LJ, Gaussoin SA, Harris D, Johnson KC, Kimmel PL, Kurella Tamura M, Launer LJ, Lerner AJ, Lewis CE, Martindale-Adams J, Moy CS, Nichols LO, Oparil S, Ogrocki PK, Rahman M, Rapp SR, Reboussin DM, Rocco MV, Sachs BC, Sink KM, Still CH, Supiano MA, Snyder JK, Wadley VG, Walker J, Weiner DE, Whelton PK, Wilson VM, Woolard N, Wright JT, Jr., Wright CB, Williamson JD, Bryan RN. Association of intensive vs standard blood pressure control with cerebral white matter lesions. *Jama.* 2019;322:524-534
223. White WB, Wakefield DB, Moscufo N, Guttmann CRG, Kaplan RF, Bohannon RW, Fellows D, Wolfson L. Effects of intensive versus standard ambulatory blood pressure control on cerebrovascular outcomes in older people (infinity). *Circulation.* 2019
224. Peng J, Lu F, Wang Z, Zhong M, Sun L, Hu N, Liu Z, Zhang W. Excessive lowering of blood pressure is not beneficial for progression of brain white matter hyperintense and cognitive impairment in elderly hypertensive patients: 4-year follow-up study. *Journal of the American Medical Directors Association.* 2014;15:904-910
225. Kokubo M, Shimizu A, Mitsui T, Miyagi M, Nomoto K, Murohara T, Toba K, Sakurai T. Impact of night-time blood pressure on cerebral white matter hyperintensity in elderly hypertensive patients. *Geriatrics & gerontology international.* 2015;15 Suppl 1:59-65
226. Fagard RH, Celis H, Thijs L, Staessen JA, Clement DL, De Buyzere ML, De Bacquer DA. Daytime and nighttime blood pressure as predictors of death and cause-specific cardiovascular events in hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979).* 2008;51:55-61
227. Riba-Llena I, Nafria C, Filomena J, Tovar JL, Vinyoles E, Mundet X, Jarca CI, Vilar-Bergua A, Montaner J, Delgado P. High daytime and nighttime ambulatory pulse pressure predict poor cognitive function and mild cognitive impairment in hypertensive individuals. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2016;36:253-263

228. Takae K, Hata J, Ohara T, Yoshida D, Shibata M, Mukai N, Hirakawa Y, Kishimoto H, Tsuruya K, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Albuminuria increases the risks for both alzheimer disease and vascular dementia in community-dwelling japanese elderly: The hisayama study. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7
229. Sasaki Y, Marioni R, Kasai M, Ishii H, Yamaguchi S, Meguro K. Chronic kidney disease: A risk factor for dementia onset: A population-based study. The osaki-tajiri project. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2011;59:1175-1181
230. Viggiano D, Wagner CA, Blankestijn PJ, Bruchfeld A, Fliser D, Fouque D, Frische S, Gesualdo L, Gutierrez E, Goumenos D, Hoorn EJ, Eckardt KU, Knauss S, Konig M, Malyszko J, Massy Z, Nitsch D, Pesce F, Rychlik I, Soler MJ, Spasovski G, Stevens KI, Trepiccione F, Wanner C, Wiecek A, Zoccali C, Unwin R, Capasso G. Mild cognitive impairment and kidney disease: Clinical aspects. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2019
231. Sharma S. Hepatocyte growth factor in synaptic plasticity and alzheimer's disease. *TheScientificWorldJournal*. 2010;10:457-461
232. Zhu Y, Hilal S, Chai YL, Ikram MK, Venketasubramanian N, Chen CP, Lai MKP. Serum hepatocyte growth factor is associated with small vessel disease in alzheimer's dementia. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:8
233. Tsuboi Y, Kakimoto K, Nakajima M, Akatsu H, Yamamoto T, Ogawa K, Ohnishi T, Daikuhara Y, Yamada T. Increased hepatocyte growth factor level in cerebrospinal fluid in alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica*. 2003;107:81-86
234. Montaner J, Ramiro L, Simats A, Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Bustamante A, Rosell A. Matrix metalloproteinases and adams in stroke. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76:3117-3140
235. Fores R, Alzamora MT, Pera G, Baena-Diez JM, Mundet-Tuduri X, Toran P. Contribution of the ankle-brachial index to improve the prediction of coronary risk: The artper cohort. *PloS one*. 2018;13:e0191283
236. Fowkes FGR, Murray GD, Butcher I, Folsom AR, Hirsch AT, Couper DJ, Debacker G, Kornitzer M, Newman AB, Sutton-Tyrrell KC, Cushman M, Lee AJ, Price JF, D'Agostino RB, Sr., Murabito JM, Norman P, Masaki KH, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CDA,

- McDermott MM, Stoffers HEJH, Knottnerus JA, Ogren M, Hedblad B, Koenig W, Meisinger C, Cauley JA, Franco O, Hunink MGM, Hofman A, Witteman JC, Criqui MH, Langer RD, Hiatt WR, Hamman RF, Ankle Brachial Index C. Development and validation of an ankle brachial index risk model for the prediction of cardiovascular events. *Eur J Prev Cardiol.* 2014;21:310-320
237. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *The New England journal of medicine.* 2003;348:1215-1222
238. Saini M, Ikram K, Hilal S, Qiu A, Venketasubramanian N, Chen C. Silent stroke: Not listened to rather than silent. *Stroke.* 2012;43:3102-3104
239. Smith EE, Saposnik G, Biessels GJ, Doubal FN, Fornage M, Gorelick PB, Greenberg SM, Higashida RT, Kasner SE, Seshadri S, American Heart Association Stroke C, Council on Cardiovascular R, Intervention, Council on Functional G, Translational B, Council on H. Prevention of stroke in patients with silent cerebrovascular disease: A scientific statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke.* 2017;48:e44-e71
240. Maestrini I, Altieri M, Di Clemente L, Vicenzini E, Pantano P, Raz E, Silvestrini M, Provinciali L, Paolino I, Marini C, Di Giuseppe M, Russo T, Federico F, Coppola C, Prontera MP, Mezzapesa DM, Lucivero V, Parnetti L, Sarchielli P, Peducci M, Inzitari D, Carlucci G, Serrati C, Zat C, Cavallini A, Persico A, Micieli G, Bastianello S, Di Piero V. Longitudinal study on low-dose aspirin versus placebo administration in silent brain infarcts: The silence study. *Stroke research and treatment.* 2018;2018:7532403-7532403
241. Ward SA, Raniga P, Ferris NJ, Woods RL, Storey E, Bailey MJ, Brodtmann A, Yates PA, Donnan GA, Trevaks RE, Wolfe R, Egan GF, McNeil JJ, on behalf of the Aig. Aspre-neuro study protocol: A randomized controlled trial to determine the effect of low-dose aspirin on cerebral microbleeds, white matter hyperintensities, cognition, and stroke in the healthy elderly. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society.* 2017;12:108-113
242. Mutlu U, Adams HH, Hofman A, Lugt A, Klaver CC, Vernooij MW, Ikram MK, Ikram MA. Retinal microvascular calibers are associated with enlarged perivascular spaces in the brain. *Stroke.* 2016;47:1374-1376
243. Sasaki M, Sone M, Ehara S, Tamakawa Y. Hippocampal sulcus remnant: Potential cause of change in signal intensity in the hippocampus. *Radiology.* 1993;188:743-746



