

**TESIS DOCTORAL**

**ATEROSCLEROSIS  
INTRACRANEAL ASINTOMÁTICA:**

PREVALENCIA, FACTORES CLÍNICOS  
Y BIOMARCADORES ASOCIADOS

**AUTOR:**

**ELENA LÓPEZ-CANCIO MARTÍNEZ**

**DIRECTORES:**

**ANTONIO DÁVALOS ERRANDO  
JUAN FRANCISCO ARENILLAS LARA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2012



El Dr. ANTONIO DÁVALOS ERRANDO y el Dr. JUAN FRANCISCO ARENILLAS LARA como directores de la tesis

**CERTIFICAN:**

Que **Elena López-Cancio Martínez** ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral titulada: “Aterosclerosis Intracraneal Asintomática: Prevalencia, factores clínicos y biomarcadores asociados”, la cual se ha desarrollado en el Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el certificado en Barcelona a 20 de Abril de 2012.

**Firmado:**

Dr. **Antonio Dávalos Errando**

Dr. **Juan Francisco Arenillas Lara**

La presente tesis se ha desarrollado en el Departamento de Neurociencias del Hospital Germans Trias i Pujol con el soporte de una beca FIS (PI07/0393) y un contrato de investigación Río Hortega, co-financiado por el Instituto de Salud Carlos III y la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol.

A cabo esta tesis y siento que en cierta manera completo una pequeña etapa de mi vida. Esta etapa empezó tras acabar mis estudios de Medicina, cuando decidí venir a Barcelona para formarme como Neuróloga. Fue muy duro dar el paso y separarme de los míos, y me asustaba esta nueva época llena de novedades. Por suerte no he estado sola en este camino, ya que Sergio pronto me siguió consiguiendo que esta “aventura” se convirtiese en un punto y seguido en mi vida. Desde que estamos juntos, él me ha brindado todo su apoyo incondicional y la fuerza necesaria para seguir adelante en los momentos más duros. Y por eso es al primero al que tengo tanto que agradecer. Gracias niño por tu transparencia, por tu honestidad, por tu amor infinito, por tu amistad verdadera. Gracias por entender mi trabajo y mis ausencias, por tu entrega desinteresada, por escucharme, por tus consejos. Gracias porque me reconforta tanto saber que siempre te tendré a mi lado. Sergio es además la persona que ha realizado con esmero la maquetación de la presente tesis.

Creo firmemente ahora que lo aprendido en estos siete años acabará siendo un pilar fundamental para mi futura vida profesional, y que también las experiencias vividas me han enriquecido mucho como persona. Desde el punto de vista clínico, al empezar la residencia me costó convivir con la enfermedad y la muerte. Aunque durante nuestra larga carrera universitaria estudiamos párrafos y párrafos repletos de patologías, no es hasta que te topas con ellas día y noche cuando verdaderamente tienes una idea de la fragilidad de nuestra existencia. Esto hace que aprendas a apreciar aún más todo lo que tienes. Además, en el hospital, no sólo convives con los pacientes, sino con el dolor y la preocupación de sus allegados, y eso te hace tener que enfrentarte a los problemas directamente, aprendes a dar malas noticias utilizando un lenguaje cercano y empático, aprendes también a contener tus emociones. A la vez, muchos pacientes y familiares se convierten para nosotros en verdaderos ejemplos de fortaleza, dignos de admiración. Es una gran responsabilidad esto de ser médico, pero a la vez es una profesión que te aporta tantas otras cosas... En el caso de la Neurología, y en concreto del ictus agudo, las consecuencias para el paciente son tan inmediatas y tan catastróficas, que aún ahora me estremecen. Por eso es tan gratificante observar cómo a veces podemos intervenir y cambiar las cosas en medio de tanto *caos neuronal*. En este sentido, el haberme formado en el servicio de Neurología del Hospital Germans Trias i Pujol me ha aportado la mejor de las experiencias. La fuerza y disciplina con la que todo el equipo de la Unidad de Ictus trabaja para conseguir mejorar y avanzar en la atención, los tratamientos y los cuidados de estos pacientes es el ejemplo ideal de cómo debe actuar un servicio médico.

Desde el punto de vista científico, aquí he aprendido desde bien pronto lo que verdaderamente significa la medicina basada en la evidencia, y cómo caminan de la mano la medicina y la investigación. En los tres años posteriores a mi residencia he tenido el privilegio de seguir desarrollando estos dos ámbitos de mi vida profesional al lado de los mejores.

Esta tesis representa para mí el mejor fruto de aquella decisión que tanto me costó tomar hace años y de la que no me arrepiento, y en ella van inmersos muchos sacrificios personales y lecciones aprendidas.

Los trabajos presentados en esta tesis forman parte de un estudio original diseñado por el Dr. Juan Arenillas y en el que me siento muy orgullosa de haber participado tan activamente todos estos años. A Juan le debo la confianza que depositó en mí para llevar a cabo este proyecto junto a él, cuando era yo aún una residente. Gracias Juan por tu talento, tu cercanía y tu generosidad. Recuerdo con mucha emoción cómo Sergio me ayudó a preparar los cuadernillos de recogida de datos, y cómo más tarde surgió el acrónimo del estudio-AsIA-. Poco después empezaría el reclutamiento de pacientes. Cuando Juan se fue a Valladolid, fue el Dr. Antoni Dávalos el que continuó depositando su confianza en mí y gracias a él pude continuar con el proyecto al finalizar la Residencia. El Dr. Dávalos será siempre para mí un referente desde el punto de vista profesional. *Jefe*, gracias por tu confianza, por tus consejos, por tus incansables ganas de continuar progresando. Gracias por enseñarme tantas cosas, incluso a contar camellos.

En el proyecto AsiA han participado muchas personas y sin ellas tampoco habría sido posible este trabajo. Laura Dorado es una parte fundamental, con ella he compartido esta experiencia “mano a mano”. La inclusión de casi mil pacientes en el estudio se nos hacía a momentos un reto imposible, pero al final lo conseguimos. Laura, gracias por tu sinceridad y por tu cercanía, por tu espontaneidad. Silvia Reverté y Anna Suñol también han pasado por la *AsIA*tización de una manera directa, muchas gracias a las dos por vuestra dedicación y ayuda. Gracias a Amparo Galán por su soporte desde el laboratorio, a Noemí por la programación de los pacientes, y a los compañeros del estudio PERART y del subestudio de Neuropsicología por su colaboración inestimable en este proyecto.

En el Hospital de Can Ruti encontré además un equipo humano con el que es un verdadero placer trabajar y que me ha hecho sentir “como en casa” todo este tiempo. Nada más aterrizar en el Servicio de Neurología,

Domingo Escudero me cautivó con su sabiduría, humor y anécdotas infinitas. Domingo, gracias por tu complicidad en tantos momentos. En la Unidad de Ictus encontré a Mónica Millán, la “madre” dentro y fuera de casa, un ejemplo fantástico del método científico aplicado a lo cotidiano. Mónica, gracias por toda tu ayuda desde que empecé la residencia. Gracias por no desistir en enseñarnos a hacer las cosas aún mejor cada día. A las otras chicas del *harén*: Natalia, la efectividad en persona, con la que es un verdadero placer trabajar; Meritxell, la dulzura personificada; Cristina, la trabajadora incansable; Aitziber, la pionera del angiosuit. Gracias a todas por enseñarme tantas cosas. Gracias también a Carlos Castaño y a Pablo por mostrarnos vuestra destreza y tesón cada día. Quiero también mencionar con especial cariño a Ana Clara, Juan Luis, Alicia e Irina. Gracias de verdad porque habéis estado conmigo en los momentos más difíciles, y vuestros gestos y palabras de cariño me han ayudado a continuar el camino dentro y fuera del hospital. Gracias por vuestra amistad sincera. Al resto del equipo de Neurología, a los residentes, a las enfermeras; a todos gracias.

Y bueno, llega la parte personal de los agradecimientos. Se me hace en estos momentos un poco dura, la verdad. Es obvio que todo este trabajo realizado fuera de mi casa, de mi tierra, ha hecho que no pudiera disfrutar de los míos todo lo que quisiera, que es siempre. Quien no ha estado lejos de su hogar, no puede entender lo que supone volver sólo 5 o 6 fines de semana al año. Aunque antes he mencionado que ahora no me arrepiento de mi decisión inicial de partir lejos, ha habido momentos en los que las fuerzas me flaquearon, y mucho. Empiezo por ti papá, porque enfermaste mientras trabajaba duramente en este proyecto y porque una maldita guardia (una espina que creo que nunca me podré quitar) me impidió estar ahí en tus últimas palabras, en tus últimas miradas. Porque aunque ya no estés, siento de verdad que me escuchas. Gracias papá por tu cariño, por tu inteligencia, por tu tolerancia, por tus ganas de vivir y por tu fuerza para superar adversidades. Gracias por enseñarme lo que es formar y mantener unida a una gran familia, grande en todos los sentidos. Gracias a ti también mamá, porque eres un modelo de entereza, de coraje y de generosidad infinita. Tu conciencia siempre limpia es el ejemplo que sigo cada día y me hace sentirme tan serena. Gracias por arroparme y cuidarme. Gracias a vosotros Faló, Marta, Cris, Óscar, Raúl, Fernando. Gracias por todos los momentos que compartimos y los que seguiremos compartiendo, porque no sólo sois mis hermanos sino mis amigos, y sé que siempre puedo contar con vosotros. Gracias por último a mis amigos de verdad, a los de siempre, a los que confían en mí y en los que confío.

- ACA:** Arteria cerebral anterior
- ACI:** Arteria carótida interna
- ACM:** Arteria cerebral media
- ACP:** Arteria cerebral posterior
- ADMA:** Dimetil-arginina asimétrica
- ARM:** Angiografía por Resonancia Magnética
- ATC:** Angiografía por Tomografía Computerizada
- CAC:** Calcio intracoronario
- DL:** Dislipemia
- DM:** Diabetes Mellitus
- DTC:** Doppler transcraneal
- GIM:** Grosor Íntima-Media carotídeo
- HDL:** Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
- HRMR:** High Resolution Magnetic Resonance
- HTA:** Hipertensión arterial
- ITB:** Índice Tobillo-Brazo
- IVUS:** Intravascular ultrasonology
- LDL:** Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
- Lp-PLA2:** Lipoproteína asociada a la Fosfolipasa-A2
- MMP:** Metaloproteinasa de Matriz
- ON:** Óxido Nítrico
- PAI-I:** Inhibidor del Activador del Plasminógeno-I
- PCR:** Proteína C Reactiva
- RM:** Resonancia Magnética
- TAG:** Triglicéridos
- TCCD:** Dúplex (eco-Doppler color) transcraneal

*“And this old man, a few hours before his death told me that he had lived one hundred years and that he did not feel any bodily ailment other than weakness; and thus while sitting on a bed in the hospital of Santa Maria Nuova at Florence, without any movement or sign of anything amiss he passed from this life. And I made an anatomy in order to see the cause of so sweet a death which I found to proceed from debility through lack of blood and failure of the artery which feeds the heart and the other lower organs, which I found to be very dried, shrunken and withered(..). The other anatomy was that of a child of 2 years in which I found everything opposite to that of the old man. The old who enjoy good health die through lack of nourishment. This happens because the passage of the vessels is continually narrowed by the thickening of the coats of these vessels. And the process continues until it affects the capillary vessels which are the first to close up entirely. As a consequence of this the old dread the cold more than the young, and those that are very old have a skin the color of wood or dried chestnut because the skin is almost completely deprived of nourishment(...). The vessels in the young are straight and full of blood, and in the old are tortuous, flattened, wrinkled and empty of blood (...). The coats of the vessels behave in man as in oranges, in which the peel thickens and the pulp diminishes the older they become”.*

**Leonardo Da Vinci, 1504-1506**

Anatomical Manuscript, folio B. Anotaciones al margen tras la autopsia de un anciano bajo la cabecera  
“Naturaleza de los vasos en la juventud y en el envejecimiento”.  
Tomado de “Leonardo Da Vinci. The Human Body”, Gramercy Books, Nueva York, 2003.

**Agradecimientos** ..... I

**Índice de Acrónimos** ..... II

**Prefacio** ..... III

**Índice General** ..... IV

**I. Introducción** ..... I

I.1. ATEROSCLEROSIS: GENERALIDADES ..... 2

    I.1.1. Definición y concepto global: una enfermedad sistémica ..... 2

    I.1.2. La aterosclerosis subclínica: un largo silencio ..... 5

    I.1.3. Impacto sociosanitario e importancia del desarrollo de medidas preventivas:  
            marcadores clínicos, biológicos e instrumentales para la detección de sujetos en riesgo ..... 7

I.2. ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL DE GRAN VASO ..... 12

    I.2.1. Definición y particularidades de las arterias intracraneales ..... 12

    I.2.2. Métodos diagnósticos ..... 14

        I.2.2.1. *Métodos diagnósticos invasivos: la arteriografía convencional* ..... 14

        I.2.2.2. *Métodos diagnósticos no invasivos* ..... 15

        I.2.2.3. *Desarrollo de nuevos métodos diagnósticos* ..... 18

    I.2.3. Impacto sociosanitario de la aterosclerosis intracraneal ..... 19

        I.2.3.1. *Ictus isquémico y aterosclerosis intracraneal sintomática* ..... 19

        I.2.3.2. *Deterioro cognitivo y aterosclerosis intracraneal* ..... 20

        I.2.3.3. *Aterosclerosis intracraneal y su relación con la aterosclerosis a otros niveles* ..... 21

I.3. ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL SINTOMÁTICA ..... 22

    I.3.1. Epidemiología: importancia de la raza y de los factores de riesgo vascular ..... 22

    I.3.2. Pronóstico y progresión de las lesiones ..... 23

    I.3.3. Biomarcadores circulantes relacionados con su presencia y progresión ..... 25

    I.3.4. Prevención secundaria. Cuestiones abiertas ..... 27

I.4. ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL ASINTOMÁTICA ..... 29

    I.4.1. Epidemiología y factores de riesgo vascular ..... 29

        I.4.1.1. *Estudios de prevalencia en poblaciones asiáticas* ..... 29

        I.4.1.2. *Falta de estudios de prevalencia en poblaciones caucásicas* ..... 30

    I.4.2. Pronóstico y progresión de las lesiones asintomáticas ..... 31

    I.4.3. Biomarcadores circulantes y aterosclerosis intracraneal asintomática: un campo inexplorado ..... 33

        I.4.3.1. *Marcador de disfunción endotelial: la dimetil-arginina asimétrica (ADMA)* ..... 34

        I.4.3.2. *Marcador inflamatorio: La proteína C reactiva (PCR)* ..... 35

        I.4.3.3. *Entre la inflamación y la resistencia insulínica: la resistina* ..... 35

        I.4.3.4. *Marcador de la inhibición de la fibrinólisis endógena: el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)* ..... 36

    I.4.4. Prevención primaria: ausencia de recomendaciones específicas para su detección y tratamiento ..... 36



<b>2. Hipótesis y Objetivos.</b> . . . . .	<b>38</b>
<b>3. Metodología</b> . . . . .	<b>40</b>
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO: ESTUDIO DE BASE POBLACIONAL . . . . .	42
3.2. FASE DE RECLUTAMIENTO Y MUESTRA FINAL DEL ESTUDIO . . . . .	44
3.3. VARIABLES CLÍNICAS BASALES. . . . .	45
3.4. DETECCIÓN DE ATEROSCLEROSIS INTRA Y EXTRACRANEAL. . . . .	46
3.4.1. Protocolo de ultrasonología . . . . .	46
3.4.2. Protocolo de Resonancia Magnética. . . . .	47
3.5. ESTUDIO NEUROPSICOLÓGICO BASAL . . . . .	48
3.6. BIOBANCO: DETERMINACIÓN DE PERFIL BIOQUÍMICO, ÍNDICE HOMA Y BIOMARCADORES CIRCULANTES . . . . .	48
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. . . . .	49
<b>4. Resultados</b> . . . . .	<b>50</b>
4.1. ARTÍCULO 1: The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis study (AsIA): rationale and design . . . . .	51
4.2. ARTÍCULO 2: The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis Study (AsIA): prevalence and risk factors. . . . .	61
<b>5. Síntesis de los Resultados y Discusión</b> . . . . .	<b>67</b>
5.1. ESTUDIO DE BASE POBLACIONAL BARCELONA-ASIA (ASYMPTOMATIC INTRACRANIAL ATHEROSCLEROSIS STUDY): PUNTOS FUERTES, OBJETIVOS FUTUROS Y LIMITACIONES . . . . .	68
5.2. PREVALENCIA DE LA ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL ASINTOMÁTICA EN POBLACIÓN CAUCÁSICA Y FACTORES DE RIESGO VASCULAR ASOCIADOS: COMPARACIÓN CON ESTUDIOS EN POBLACIÓN ASIÁTICA . . . . .	72
5.3. DIFERENTE PERFIL DE FACTORES DE RIESGO VASCULAR Y BIOMARCADORES CIRCULANTES EN LA DISTRIBUCIÓN EXTRA-INTRACRANEAL DE LA ATEROSCLEROSIS ASINTOMÁTICA: PAPEL DEL SÍNDROME METABÓLICO Y LA RESISTENCIA INSULÍNICA EN LA ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL. . . . .	75
5.4. IMPLICACIONES DIRECTAS DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS . . . . .	80
<b>6. Conclusiones</b> . . . . .	<b>81</b>
<b>7. Bibliografía.</b> . . . . .	<b>83</b>
<b>8. Anexos</b> . . . . .	<b>97</b>
ANEXO I: ARTICULO 3 - Distribution and severity of asymptomatic extra & intracranial atherosclerosis: differential risk factor and biomarker profiles. . . . .	98
ANEXO II: TABLAS REGICOR para el cálculo del riesgo vascular . . . . .	107



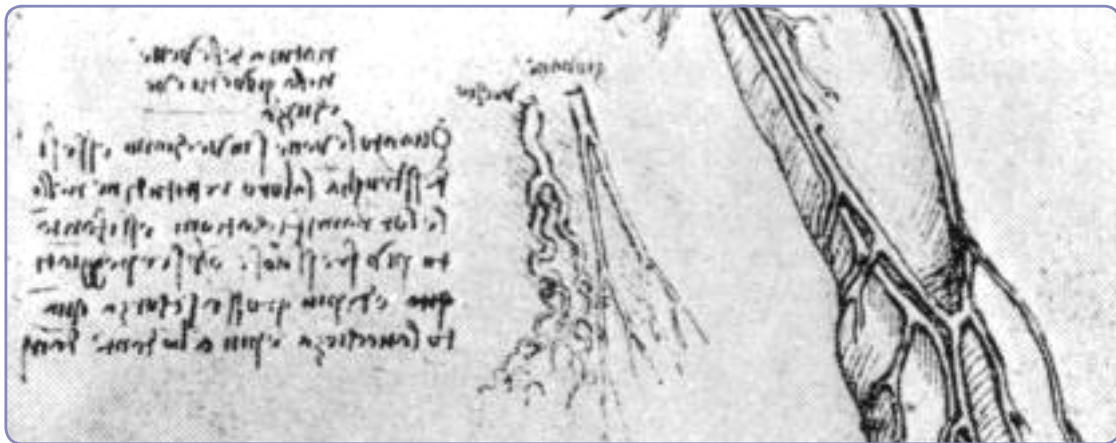
# INTRODUCCIÓN

## I.I. ATEROSCLEROSIS: GENERALIDADES

### I.I.I. Definición y concepto global: una enfermedad sistémica

La palabra aterosclerosis (del griego “atheros”, pulpa o papilla y “skleros”, duro) indica la acumulación de lípidos, células y tejido fibroso (placas de ateroma) en la pared arterial provocando su endurecimiento y pérdida de elasticidad.

La primera descripción macroscópica documentada de lo que sería mucho más adelante conocido como aterosclerosis bien podría haber sido la realizada por Leonardo Da Vinci a principios del siglo XVI, tras la autopsia de un anciano (*il vecchio, Figura 1 y prefacio*). Captaron la atención del genio las importantes diferencias en la anatomía de los vasos sanguíneos del anciano en comparación con lo observado unos años antes en la autopsia de un niño. Leonardo apuntó al efecto que la edad había ejercido en los mismos destacando especialmente el engrosamiento de su pared, su elongación y tortuosidad y la constricción de la luz que provocaban estos cambios dificultando el paso de la sangre a su través <sup>1</sup>.



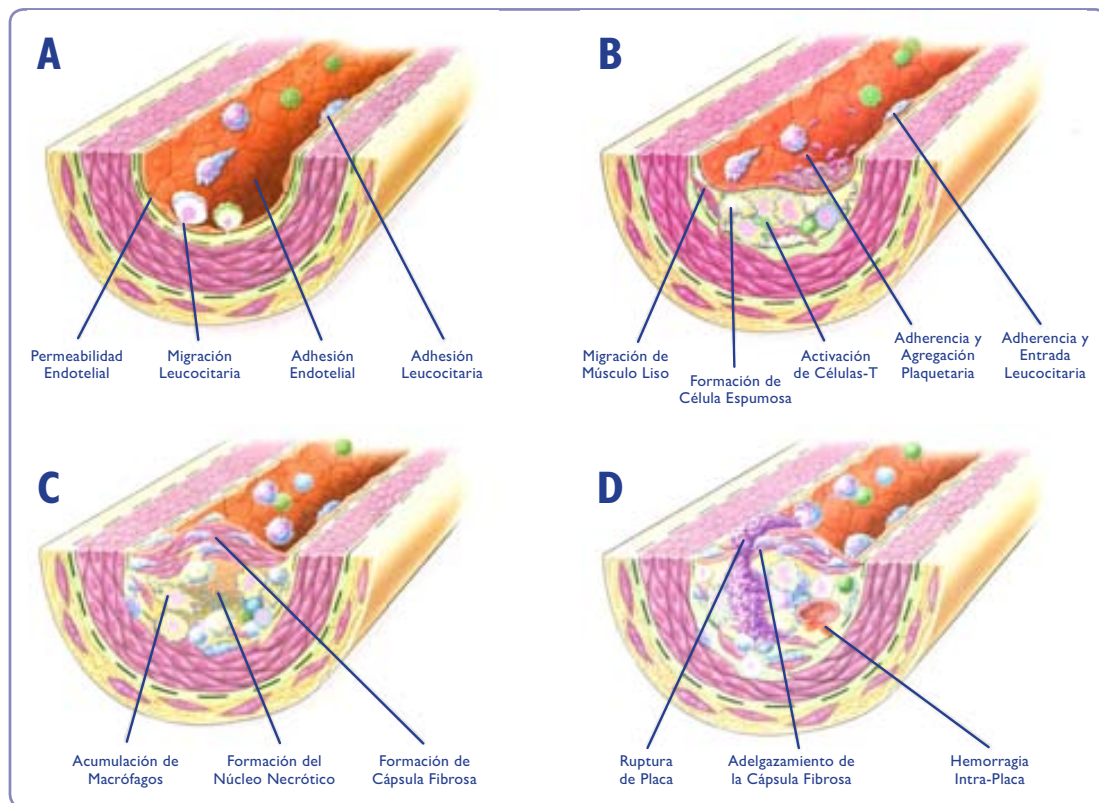
**Figura 1:** Dibujo y anotaciones realizadas por Leonardo Da Vinci (1506) bajo la cabecera “Naturaleza de los vasos en la juventud y en el envejecimiento”. En escritura especular puede leerse “anciano” y “niño” encima de los dibujos esquemáticos de las arterias.

Keele, 1973

Desde mediados del siglo XIX, con el desarrollo de las técnicas microscópicas, muchos han sido los trabajos dedicados al estudio de esta patología arterial. El término general arterioesclerosis (“endurecimiento de las arterias”) fue acuñado por Lobstein en 1833 y más adelante, en 1904 Marchand utilizó el que después sería más ampliamente aceptado, la aterosclerosis (el cual, como hemos comentado ante-

riormente, incluye además la noción del depósito de material en la pared del vaso). En la primera mitad del siglo XX el patólogo Aschof describió detalladamente los cambios histológicos producidos en el proceso aterosclerótico, apuntando a que el origen de los lípidos y proteínas depositados en la pared de las arterias debía provenir de la sangre circulante y que supuestas características “físico-químicas” desconocidas por aquel entonces favorecerían el desarrollo de las lesiones en la edad avanzada e incluso en unas localizaciones más que en otras<sup>2</sup>. En los años 90 la American Heart Association (AHA) publicó una clasificación de las lesiones ateroscleróticas en ocho tipos, desde sus estadios más precoces hasta los más avanzados<sup>3-5</sup>. Es en 1999 cuando Russell Ross afirma que la aterosclerosis es mucho más que un mero depósito de lípidos en la pared arterial y establece la actual hipótesis inflamatoria aceptada universalmente<sup>6</sup>.

Ross describe la aterosclerosis como un proceso inflamatorio dinámico que acontece como respuesta a un daño o agente nocivo. Propone diferentes factores que pueden inducir la cascada inflamatoria en la aterogénesis: lípidos (fundamentalmente LDL) modificados por la diabetes o agentes oxidantes, radicales libres, la hipertensión arterial, la hiperhomocisteinemia, factores genéticos, determinadas infecciones o combinaciones de los previos. En el citado artículo Ross establece además por primera vez que la *disfunción endotelial* constituye el estadio inicial del proceso aterosclerótico, previo a la lesión estructural del endotelio. El endotelio, la monocapa de células que tapiza el interior de todos los vasos sanguíneos, no actúa sólo como interfase inerte, sino que se trata de un “órgano” regulador capaz de secretar múltiples sustancias vaso activas. Interviene en la modulación del tono vasomotor, controla activamente el intercambio de sustancias entre el espacio extra e intravascular, la activación plaquetaria y la proliferación del músculo liso, entre otras funciones. Así, la denominada disfunción endotelial que acontece en el inicio de la aterogénesis, implica por un lado, una deficiente expresión de óxido nítrico (ON) que se asocia a una inadecuada vasodilatación, y por otro, un aumento anómalo de su permeabilidad permitiendo el paso de lipoproteínas y otros constituyentes plasmáticos. Se activa además la secreción de moléculas de adhesión leucocitaria y endotelial que permiten la migración leucocitaria desde la luz al interior de la pared arterial (*Figura 2, panel A*).



**Figura 2:** Fases de la aterosclerosis.

**A:** Disfunción endotelial; **B:** Formación de la estría grasa;  
**C:** Placa avanzada y complicada; **D:** Placa inestable.

*Adaptado de Ross, 1999*

Posteriormente acontece la formación de la *estría grasa*, tras la infiltración de la pared por leucocitos circulantes que posteriormente se cargan de LDL-oxidado (células espumosas), linfocitos T y también células musculares lisas que migran desde la capa media gracias a la acción de múltiples citoquinas. En estadios más avanzados se crea una cápsula fibrosa que intenta “envolver” la lesión y separarla de la luz arterial. En el interior de la lesión se produce necrosis y apoptosis, además del cúmulo de material lipídico (*core* o núcleo lipídico). Finalmente la placa puede complicarse por el adelgazamiento y ruptura de la cápsula fibrosa, lo cual habitualmente desemboca en la trombosis de la superficie de la misma, o por la formación de una hemorragia intraplaca (*Figura 2, paneles B-D*). Las placas complicadas pueden dar lugar a un embolismo arterio-arterial, ocluyéndose los vasos de menor calibre distales a la lesión, o bien producir la oclusión completa del vaso donde subyace la lesión. A esta fase se la conoce como aterotrombosis y es la causante de los insultos isquémicos producidos en los diferentes órganos irrigados por las arterias afectadas (miocardio, cerebro...).

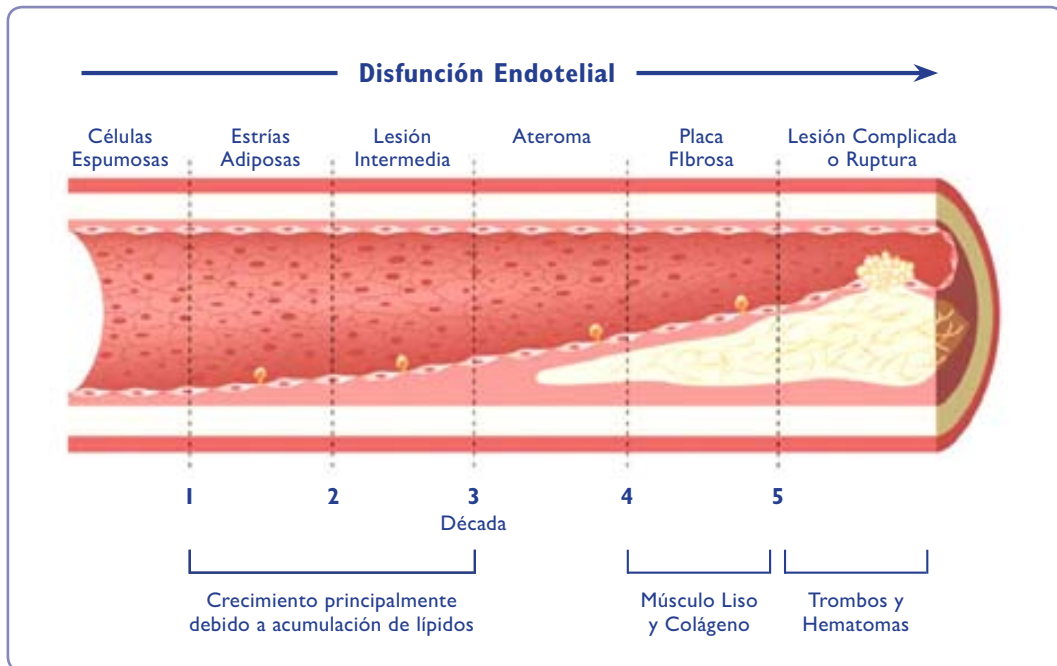
La aterosclerosis es un proceso complejo y multifactorial, en el que intervienen innumerables protagonistas. Además de los factores genéticos, moleculares y bioquímicos, los factores físicos hemodinámicos también intervienen en la aterogénesis. Así, la pérdida del flujo laminar normal en determinadas zonas como las bifurcaciones arteriales (disminución de la tensión de superficie o “*shear stress*” y aumento de las turbulencias) produce una alteración en la homeostasis del endotelio, mediada por procesos de mecano-recepción y mecano-transducción que modulan la expresión génica del mismo<sup>7</sup>. De esta forma, en esa zona concreta del vaso se produce un aumento de la expresión de determinados genes que desemboca en la regulación al alza de moléculas de adhesión endotelial y leucocitaria que comienzan el proceso. El flujo laminar también desaparece en regiones donde la placa aterosclerótica ha evolucionado y producido una disminución del calibre de la luz (estenosis), por lo que el mencionado proceso se perpetúa.

La aterosclerosis afecta principalmente a arterias de mediano y gran calibre, teniendo especial predilección por las arterias coronarias, las arterias de las extremidades inferiores, las arterias renales, y las arterias que nutren el cerebro, tanto en su porción cervical o extracraneal como en su porción intracraneal, siendo ésta última localización en la que se centrará la presente tesis doctoral.

Por tanto, podemos concluir esta primera parte de la introducción subrayando que la aterosclerosis es una enfermedad sistémica y difusa, dinámica, de naturaleza inflamatoria, multifactorial y compleja; y que en su desarrollo intervienen factores genéticos, moleculares, hemodinámicos y ambientales, unidos al inalterable efecto del envejecimiento.

### **1.1.2. La aterosclerosis subclínica: un largo silencio**

El proceso aterosclerótico comienza temprano. En la primera y segunda década de la vida ya pueden encontrarse estrías grasas en la aorta y en las arterias coronarias<sup>3</sup>. Con la edad, la presencia y severidad de las lesiones aumenta progresivamente en la aorta, las arterias coronarias y las arterias cerebrales (en este orden), según un estudio necrópsico desarrollado en Japón<sup>8</sup>. También se ha detectado *in-vivo* un aumento del grosor íntima-medio carotídeo (marcador de aterosclerosis subclínica, como veremos más adelante) en niños y adolescentes con antecedentes de hipercolesterolemia familiar, diabetes, obesidad, hipertensión y síndrome metabólico<sup>9</sup>.



**Figura 3:** Progresión de la aterosclerosis a lo largo de las décadas de vida.

Tomado de *Lectures in Atherothrombosis*, Kaski, 2007

Sin intervención alguna, con la edad y en función de las características de cada sujeto (carga de factores de riesgo, dieta, estilo de vida, *background* genético...) la aterosclerosis progresa invariablemente afectando diversas arterias en todo el organismo (Figura 3). Sin embargo, durante décadas, ninguna expresión clínica manifiesta nos alertará del desarrollo progresivo de esta enfermedad. Esta larga fase de la aterosclerosis es silenciosa, pero determinante, ya que confiere un mayor riesgo de sufrir un primer evento aterotrombótico en el futuro, el cual podría llegar a ser mortal<sup>10</sup>.

La larga fase asintomática de la aterosclerosis y sus devastadoras consecuencias cuando se presenta clínicamente hacen esenciales dos medidas: por un lado, el estudio exhaustivo de los mecanismos básicos implicados en su desarrollo y progresión desde el estadio pre-clínico<sup>11</sup> y por otro lado, el desarrollo de estrategias preventivas que retrasen o eviten la aparición de sus complicaciones en el futuro. Desarrollaremos este segundo punto en el siguiente apartado.

### **1.1.3. Impacto sociosanitario e importancia del desarrollo de medidas preventivas: marcadores clínicos, biológicos e instrumentales para la detección de sujetos en riesgo**

La aterosclerosis y sus principales manifestaciones (cardiopatía isquémica e ictus) son la primera causa de morbi-mortalidad en el mundo. Aunque siempre se ha considerado un problema propio de los países desarrollados, las enfermedades cardiovasculares constituyen una pandemia que afecta también de lleno a los países en vías de desarrollo<sup>12,13</sup>. El progresivo envejecimiento de la población, el control de las enfermedades infecciosas y la creciente adquisición de hábitos de vida no saludables han contribuido a este hecho.

El tremendo impacto sociosanitario de la aterosclerosis hace que sea esencial el desarrollo de estrategias preventivas en todo el mundo que consigan frenar o ralentizar su aparición y desarrollo. La primera estrategia en salud consiste en intentar evitar o disminuir la prevalencia de factores de riesgo modificables en la población general, a través de legislación sanitaria y campañas de concienciación y salud pública que promuevan hábitos de vida saludables a nivel global y desde la infancia (la llamada prevención primordial).

En segundo lugar, es muy importante el desarrollo de estrategias de prevención primaria en sujetos asintomáticos mediante intervenciones fundamentalmente terapéuticas para frenar o retrasar la aparición de enfermedad clínica (control exhaustivo de factores de riesgo vascular, antiagregación, tratamiento con estatinas, etc.). Estas estrategias de prevención primaria no han de ir dirigidas a toda la población, sino a aquellos individuos que tienen un riesgo alto de sufrir un evento cardiovascular en el futuro.

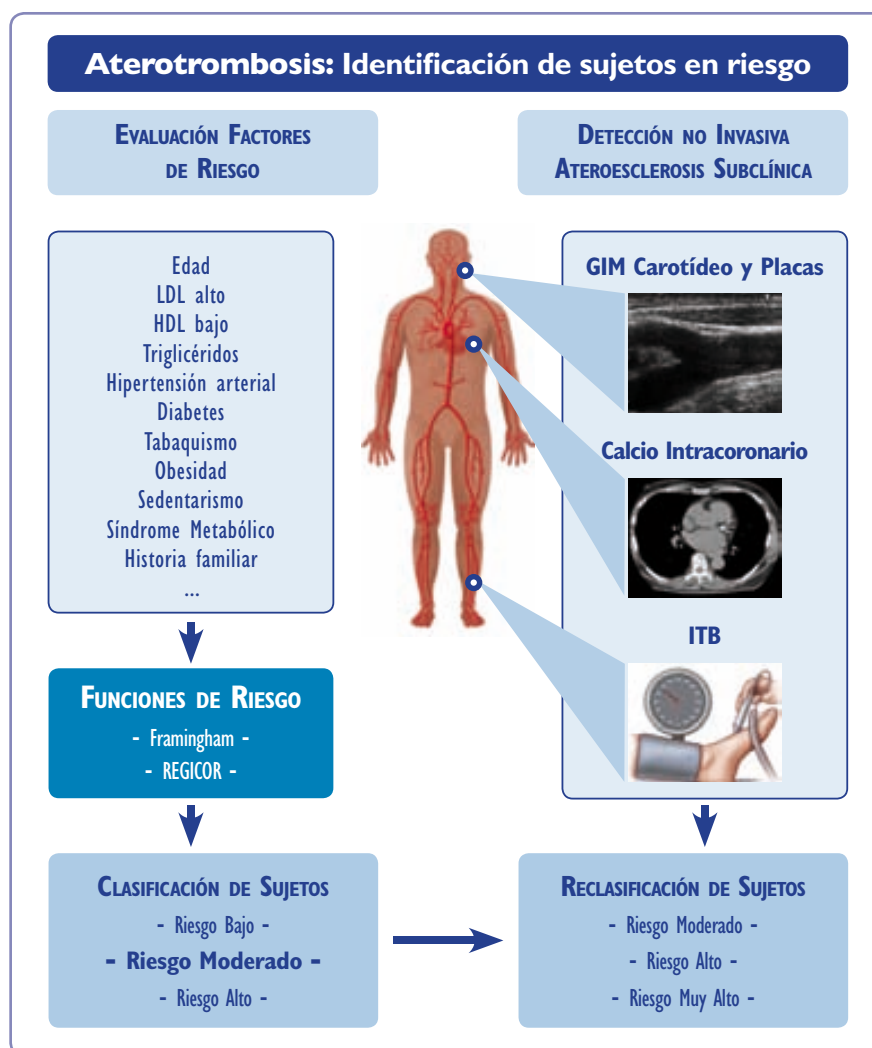
#### **Identificación de sujetos en riesgo en la población**

Para identificar en la población a los sujetos en riesgo de sufrir un evento cardiovascular y poder aplicarles las medidas preventivas oportunas, se desarrollaron inicialmente las funciones de riesgo vascular, como son la ecuación de Framingham desarrollada ya en 1976 y modificada posteriormente en 1998<sup>14,15</sup> y su adaptación a la población española, el índice REGICOR<sup>16,17</sup>. Estas funciones estiman el riesgo individual cardiovascular a los 10 años como bajo, moderado (o intermedio), alto o muy alto, en función de un cómputo facilitado por una tabla según la edad y la presencia o ausencia de determinados fac-



tores de riesgo vascular en cada individuo. En el caso de la ecuación de Framingham y el REGICOR, se tienen en cuenta la edad, el sexo, el tabaquismo, las cifras de colesterol plasmático, las cifras de tensión arterial y el antecedente de diabetes (ANEXO 2). En general, las estrategias de prevención aplicadas serán más o menos agresivas en función del grupo de riesgo al que pertenezca el individuo. Las funciones de estimación de riesgo son herramientas muy útiles y fácilmente aplicables desde la Atención Primaria, y su uso se ha extendido en los últimos años. Sin embargo, estas herramientas tienen limitaciones. Una de ellas es que tienen en cuenta sólo un número determinado de factores de riesgo, dejando fuera del cómputo otros que se han descrito con posterioridad al desarrollo de las mismas, como la obesidad, el sedentarismo o los triglicéridos plasmáticos. La segunda limitación de estas funciones y quizá la más importante es que la gran mayoría de los acontecimientos cardiovasculares se acumularán en los individuos clasificados en el grupo de riesgo moderado (el más prevalente), en los que las intervenciones muchas veces no son tan agresivas<sup>18,19</sup>.

Por eso, en los últimos años se hace hincapié en el desarrollo de nuevas herramientas que, de forma complementaria a las funciones de riesgo, nos permitan detectar al verdadero paciente “vulnerable” o susceptible de padecer un evento cardiovascular<sup>20-22</sup>. Se ha propuesto la medición de marcadores circulantes que denoten alteraciones metabólicas o estados de hipercoagulabilidad, determinación de la proteína C reactiva (PCR) y otros marcadores inflamatorios<sup>23</sup> o incluso la posibilidad de analizar factores genéticos<sup>24</sup>. Otros respaldan la detección de aterosclerosis subclínica mediante pruebas no invasivas, como son la determinación de calcio intracoronario (CAC) a través de tomografía computerizada<sup>25,26</sup>, el cálculo del grosor íntima-media carotídeo (GIM) y detección de placas carotídeas mediante ultrasonografía<sup>27</sup> o el cálculo del índice tobillo-brazo (ITB)<sup>28</sup>. En 2010 la American Heart Association (AHA) publicó por primera vez una guía para la evaluación del riesgo cardiovascular en adultos asintomáticos<sup>29</sup>, en la que se considera razonable el uso de estas tres técnicas de medición de aterosclerosis subclínica (CAC, GIM e ITB) en aquellos sujetos con un riesgo vascular moderado según las funciones de riesgo clásicas (Framingham > 10 o REGICOR > 5), ya que todas ellas han demostrado su valor en la predicción de eventos cardiovasculares con un nivel de evidencia aceptable (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema de la detección de sujetos en riesgo de sufrir eventos aterotrombóticos. **GIM:** grosor-íntima-medio. **ITB:** índice tobillo-brazo

El estudio MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) reclutó en Norteamérica 6814 sujetos de diferentes razas, con edades comprendidas entre 45 y 84 años de edad y libres de enfermedad cardiovascular al inicio. Se estudiaron marcadores de imagen, como el CAC, el IMT, el ITB, la función y masa ventricular cardíaca mediante resonancia magnética y la dilatación de la arteria braquial como medición de la disfunción endotelial. Además, se evaluaron diferentes biomarcadores circulantes inflamatorios, e incluso algunos genéticos<sup>30</sup>. Tras una media de seguimiento de 4.6 años, se detectaron 286 eventos cardiovasculares. Demostraron la validez del IMT y CAC como predictores de riesgo, siendo el IMT más útil para la predicción de riesgo de ictus y el CAC para la predicción de eventos coronarios<sup>31</sup>. En cuanto a los biomarcadores circulantes, han reportado diferencias inter-razas en la predicción del

riesgo cardiovascular, siendo la PCR un marcador de riesgo sólo en caucásicos, la interleuquina-6 (Il-6) un marcador de riesgo sólo en afro-americanos, y el fibrinógeno en caucásicos, afro-americanos e hispanos. Ninguno de los tres biomarcadores fue predictor de eventos entre los sujetos de origen chino<sup>32</sup>. Este hallazgo soporta el hecho de que las enfermedades cardiovasculares se desarrollan y manifiestan de forma diferente en función de la raza, y por tanto, en función de la carga genética de cada individuo, probablemente más allá de la diferente carga de factores de riesgo vascular o de los diferentes estilos de vida. El estudio MESA está contribuyendo al estudio de los mecanismos fisiopatológicos básicos de la aterosclerosis desde su fase subclínica así como a la detección de marcadores de riesgo. Estudios como este permiten desarrollar e individualizar estrategias de prevención primaria en la población general con el fin de minimizar las consecuencias de la aterosclerosis.

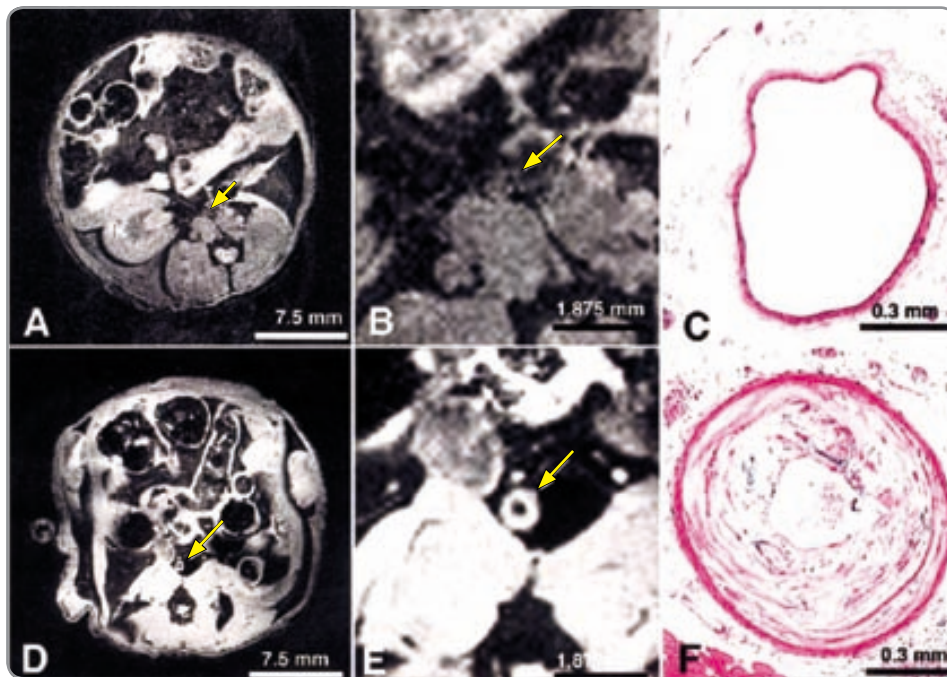
### **Identificación de la placa vulnerable**

Además del riesgo vascular global a largo plazo basado en los estudios anteriormente descritos, sería muy interesante poder conocer el riesgo concreto e individual de que una lesión aterosclerótica asintomática detectada en una localización determinada progrese y se complique. Esto es, conocer la vulnerabilidad de la placa de ateroma.

Durante muchos años, el estudio de la “placa vulnerable” se ha centrado en estudios anatómo-patológicos de autopsias y de material quirúrgico (proveniente sobre todo de endarterectomía y bypass aorto-coronario)<sup>33,34</sup>. En términos generales, la placa vulnerable con alto riesgo de ruptura suele poseer algunas de las siguientes características: inflamación activa, denotada por la infiltración de monocitos, macrófagos y linfocitos T; una cápsula fibrosa delgada y un core lipídico grande; una fisura en su superficie; una estenosis de la luz > 90% o bien una remodelación positiva de la pared arterial que evitaría la estenosis de la luz; o una hemorragia intraplaca<sup>20</sup>.

El gran desafío de los últimos años está en desarrollar técnicas de imagen que permitan estudiar la pared arterial y placa vulnerable *in vivo*<sup>35</sup>, revelando características semejantes a las observadas en estudios histológicos (Figura 5). La ultrasonografía intravascular (IVUS) coronaria ha sido ampliamente utilizada a este respecto aunque se trata de una técnica invasiva<sup>36</sup>. Para el estudio de la placa carotídea se están desarrollando fundamentalmente técnicas no invasivas, como la ecografía-Doppler carotídea<sup>37,38</sup>

o la resonancia magnética de alta definición<sup>39,40</sup>. Técnicas más costosas y sofisticadas incluyen estudios del metabolismo de la placa con tomografía de emisión de positrones (PET)<sup>41,42</sup> o incluso técnicas de imagen molecular tras la administración de nano-partículas que se unen específicamente a diversos componentes de la placa y permiten estudiar su grado de actividad<sup>43</sup>.



**Figura 5:** Imágenes de RM de alta definición de la aorta abdominal (**flecha**) de un ratón sano (paneles superiores, **A** y **B**) y un modelo animal de aterosclerosis (paneles inferiores **D** y **E**). A la derecha se pueden apreciar los correlatos histológicos (paneles **C** y **F**).

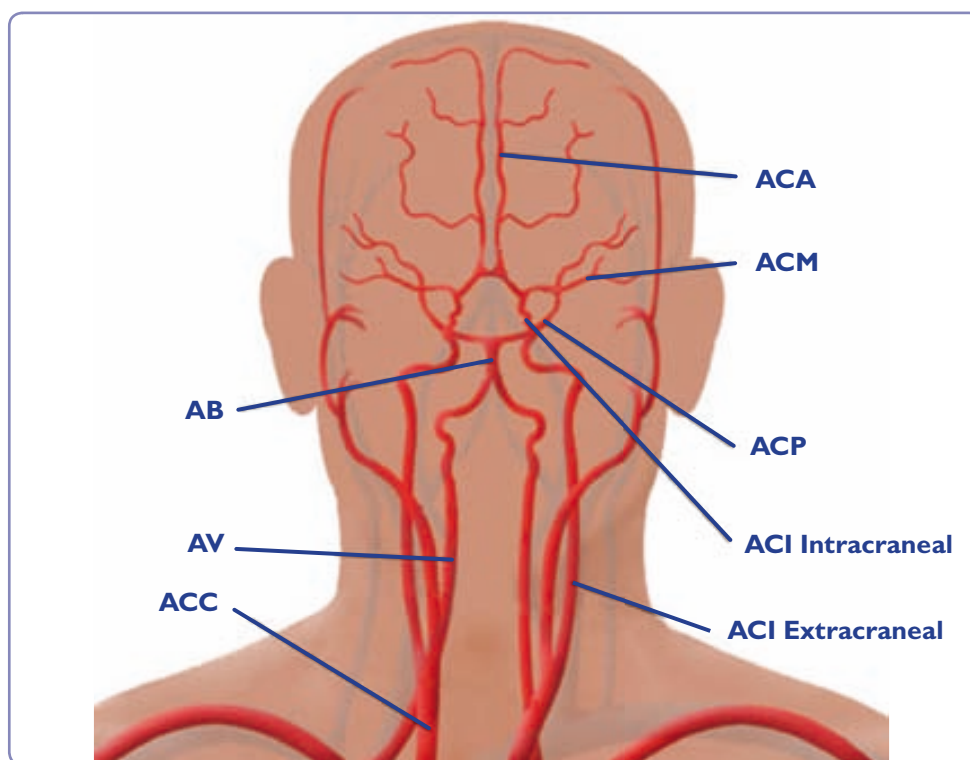
*Fayad, 1998*

Recientemente se ha publicado el diseño de un estudio observacional y prospectivo (The High-Risk Plaque BioImage Study) que pretende evaluar nuevos marcadores de imagen en la detección de la aterosclerosis subclínica y su capacidad predictiva para la detección de sujetos en riesgo de padecer eventos vasculares en el futuro<sup>44</sup>.

## I.2. ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL DE GRAN VASO

### I.2.1. Definición y particularidades de las arterias intracraneales

La aterosclerosis intracraneal se caracteriza por el desarrollo de múltiples lesiones ateromatosas en la pared de las arterias cerebrales de gran calibre: arterias carótidas internas en su porción intracraneal, arterias cerebrales medias, arterias cerebrales anteriores, arterias cerebrales posteriores, arterias vertebrales y arteria basilar (Figura 6).



**Figura 6:**

**ACC:** arteria carótida común **ACI:** arteria carótida interna; **ACM:** arteria cerebral media;  
**ACA:** arteria cerebral anterior; **ACP:** arteria cerebral posterior; **AB:** arteria basilar; **AV:** arteria vertebral

Se trata de un proceso dinámico y que afecta a toda la longitud de la arteria, aunque es en algunas zonas concretas donde la afectación de la pared condiciona un estrechamiento significativo o estenosis, siendo estas zonas las que detectamos con la mayoría de los métodos diagnósticos actuales. Por tanto, en el presente trabajo, cuando nos referimos a sujetos que presentan aterosclerosis intracraneal lo haremos en función de la detección de dichas estenosis arteriales, lo que implica un estadio avanzado de la enfermedad.

Los segmentos arteriales intracraneales más afectados por la aterosclerosis son la porción intracavernosa de la carótida interna intracraneal, el segmento proximal de la arteria cerebral media, la unión vertebro-basilar y el segmento proximal de la arteria basilar.

Las arterias intracraneales poseen algunas características hemodinámicas, anatómicas y moleculares que difieren del resto de grandes arterias del organismo. En primer lugar, la regulación del flujo sanguíneo cerebral es un sistema muy activo y complejo en el que intervienen múltiples factores y en el que las arteriolas juegan un papel fundamental. Existen elementos fisiológicos activos que mantienen la homeostasis intracerebral, siendo muy importante la producción de óxido nítrico y otras sustancias por parte del endotelio<sup>45</sup>. Además, la especial anatomía del polígono de Willis con sus anastomosis a nivel proximal (arterias comunicantes) y la existencia de anastomosis leptomeníngicas distales que fácilmente distribuyen el flujo en función de las necesidades, hacen que la hemodinámica cerebral sea única en el organismo<sup>46</sup>. En segundo lugar, existen algunas diferencias histológicas en la estructura de la pared de las arterias intracraneales respecto al resto. Las arterias intracraneales poseen una lámina elástica interna bien desarrollada pero pierden la lámina elástica externa a medida que entran en el espacio intradural<sup>47</sup>, siendo además la adventicia de un grosor más fino cuando se compara con las arterias extracraneales. La adventicia, en el espacio intradural, pierde los vasa-vasorum, nutriéndose directamente a través del líquido cefalorraquídeo<sup>48</sup>. La capa íntima presenta un endotelio muy activo con uniones endoteliales muy estrechas, que en los capilares cerebrales conforman una parte esencial de la barrera hemoatoencefálica. Las células endoteliales presentan a nivel intracerebral gran cantidad de mitocondrias, expresando así la gran actividad metabólica que realizan en la regulación de la homeostasis<sup>49</sup>. En tercer lugar, se han demostrado algunas singularidades respecto a las características moleculares y respuesta aterogénica de las arterias intracraneales. Así, en fetos humanos expuestos a hipercolesterolemia materna durante el embarazo, comparados con fetos de madres sin hipercolesterolemia, se ha demostrado mayor formación de estrías grasas en las arterias extracraneales (carótida y aorta abdominal) y apenas diferencias en la formación de estrías grasas en las arterias intracraneales (arteria cerebral media y basilar), sugiriendo que estas últimas arterias son más resistentes a los efectos aterogénicos del colesterol. Además, los autores observaron que las arterias intracraneales presentaban mayor concentración de enzimas captadores de radicales libres (en concreto de la superóxido dismutasa),

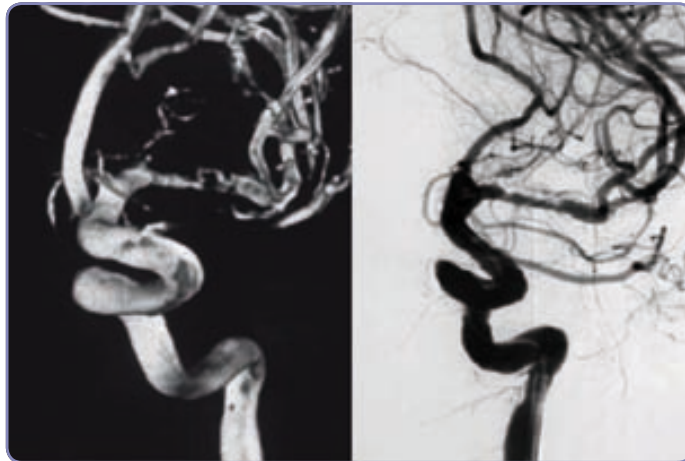
hipotetizando que las arterias intracraneales están más preparadas para combatir el estrés oxidativo<sup>50</sup>. El mismo grupo publicó con posterioridad un estudio anatómico-patológico en diferentes edades de la vida (desde fetos hasta ancianos) en el que de nuevo mostraban cómo la actividad enzimática antioxidante era mucho mayor en las arterias intracraneales comparada con las extracraneales, y cómo de forma reveladora esta actividad antioxidante disminuía progresivamente con la edad, coincidiendo con la aparición de lesiones ateroscleróticas a nivel intracraneal<sup>51</sup>. En modelos animales, también se ha demostrado que el LDL-oxidado (un promotor esencial de la aterogénesis) afecta negativamente a la respuesta vasomotora dependiente del endotelio en las arterias extracraneales (carótidas) pero no lo hace en las arterias intracraneales (basilar)<sup>52</sup>.

Por tanto, cuando nos referimos a la aterosclerosis intracraneal de gran vaso no sólo debemos pensar en la localización territorial de las lesiones ateroscleróticas sino también en el especial ambiente anatómico, hemodinámico y molecular en el que éstas se desarrollan.

## **I.2.2. Métodos diagnósticos**

### ***I.2.2.1. Métodos diagnósticos invasivos: la arteriografía convencional***

Hasta hace unos años el método diagnóstico de elección era la arteriografía convencional, y aún hoy continúa siendo la exploración de referencia (“gold standard”)<sup>53</sup>. Esta técnica (Figura 7) permite una medición precisa del grado de estenosis en función del porcentaje de reducción de la luz, así como la posibilidad de evaluar el estado de la circulación colateral cerebral. En general las estenosis se consideran leves cuando la reducción de la luz es menor al 50%, moderadas cuando la reducción de la luz es del 50-70% y graves cuando dicha reducción es igual o superior al 70%. Pero la arteriografía convencional es un procedimiento costoso, largo e invasivo que implica riesgos para el paciente. Otra limitación es que esta técnica, al igual que otros métodos diagnósticos angiográficos no invasivos, sólo nos da información sobre la reducción de la luz arterial y no sobre las características de la pared o de la placa aterosclerótica.



**Figura 7:** imagen de arteriografía convencional con su reconstrucción tridimensional (panel de la izquierda), mostrando una irregularidad de la luz de la arteria cerebral media correspondiente a una estenosis.

#### **1.2.2.2. Métodos diagnósticos no invasivos**

En los últimos tiempos han surgido métodos no invasivos que facilitan tanto la detección inicial de la patología aterosclerótica intracraneal como el estudio de su evolución en el tiempo, siendo los más utilizados los estudios ultrasonológicos, la angiografía por resonancia magnética y la angiografía por tomografía computerizada. A continuación se exponen las características básicas de dichos métodos diagnósticos:

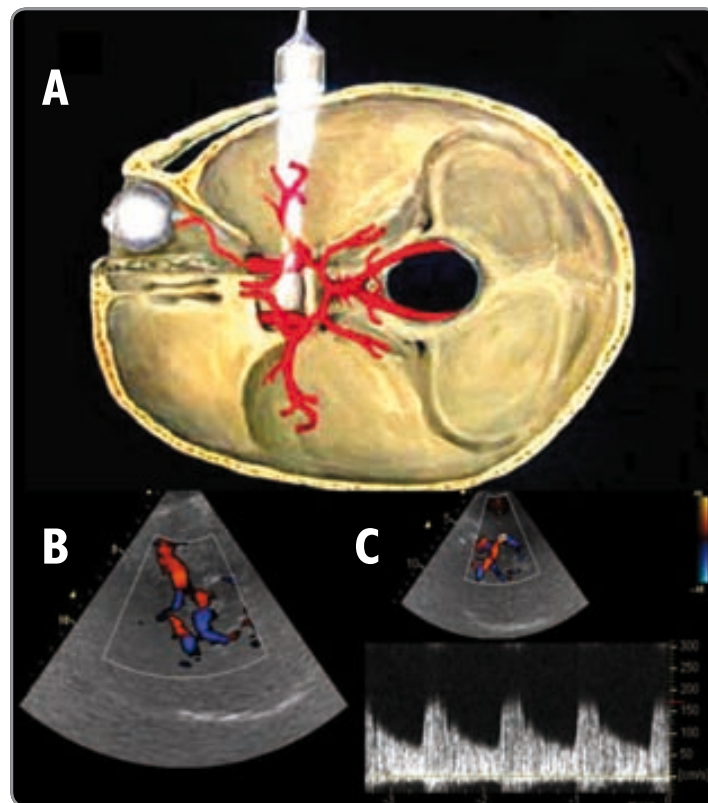
#### **Estudios ultrasonológicos: Doppler y dúplex transcraneal**

Los métodos ultrasonológicos permiten estudiar la dirección, velocidad y características del flujo sanguíneo de las grandes arterias intracraneales de forma no invasiva, rápida y en tiempo real, a través de la superficie craneal (*Figura 8*). Con respecto a los estudios angiográficos no invasivos que luego comentaremos, los cuales producen imágenes estáticas, la ultrasonología tiene una ventaja fundamental, y es que permite estudiar la hemodinámica de la circulación cerebral “en directo”, pudiendo evaluar la dirección de flujo, los circuitos compensatorios y la apertura de colaterales de una forma mucho más fisiológica.

Los segmentos arteriales que presentan estenosis condicionarán cambios hemodinámicos focales como son una mayor velocidad de flujo a su través, y una alteración en las características del mismo, haciéndose éste más turbulento (*Figura 8.C*). Generalmente la medición del grado de estenosis arterial se realiza teniendo en cuenta el pico de velocidad sistólica, como se comentará más adelante en el apartado de



metodología, aunque también se evalúan las características del espectro arterial y la repercusión en el flujo pre y postestenótico. La eco-Doppler-color o dúplex transcraneal (TCCD) presenta ventajas respecto al Doppler transcraneal (DTC), como son la posibilidad de visualizar en color las arterias en todo su trayecto y sus relaciones anatómicas, así como la posibilidad de calibrar el ángulo de insonación, lo cual hace que el cálculo de la velocidad de flujo sea más exacto. Será éste el método utilizado en el estudio de nuestros pacientes, como se explicará más adelante. Ha sido demostrada una buena correlación entre los métodos ultrasonológicos y la arteriografía convencional<sup>54-56</sup> en la detección de estenosis intracraneales.

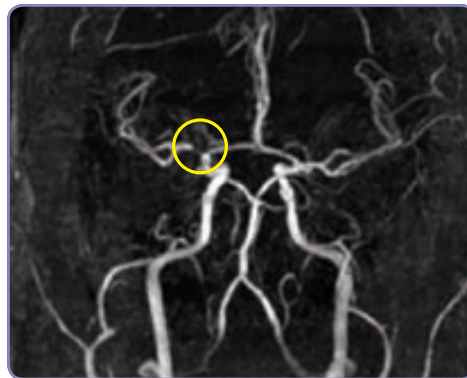


**Figura 8:** (A) Imagen representativa de la aplicación de ultrasonidos para la evaluación de las arterias intracraneales. (B) Imagen en color obtenida por dúplex transcraneal, con la distribución de las principales arterias del polígono de Willis. (C) Curva espectral obtenida en un punto de estenosis, con aumento de la velocidad sistólica.

La principal desventaja de los métodos ultrasonológicos es la existencia de una ventana acústica deficiente a través de la superficie ósea craneal, que puede dificultar la realización del estudio en hasta un 20% de los casos. Sin embargo, esta limitación se supera ampliamente con la utilización de eco-contrastes endovenosos.

### **Angiografía por Resonancia Magnética (ARM)**

Permite obtener imágenes en tres dimensiones de todo el árbol vascular intracraneal (*Figura 9*), y detecta oclusiones y estenosis arteriales con una alta sensibilidad y especificidad comparado con la arteriografía convencional<sup>57</sup>. Las ventajas de la técnica incluyen la no utilización de contraste, y la ausencia de radiación durante la exploración. El principal inconveniente es la sobreestimación del grado de estenosis en estenosis graves, el largo tiempo de adquisición de las imágenes y la aparición de artefactos de movimiento, así como las contraindicaciones generales para la realización de una resonancia magnética (prótesis metálicas, marcapasos...).



**Figura 9:** Imagen de Angiografía por Resonancia Magnética (ARM). Se aprecia estenosis del segmento proximal de la ACM derecha (**círculo**)

### **Angiografía por Tomografía Computerizada (ATC)**

Se obtienen imágenes tridimensionales similares a los obtenidos por ARM pero en un tiempo de exploración menor. Los inconvenientes principales son la necesidad de administración de contraste yodado endovenoso y la radiación a la que es sometida el paciente. La ATC ha demostrado muy buena correlación con respecto a la arteriografía convencional en la detección de estenosis intracraneales<sup>58</sup>.

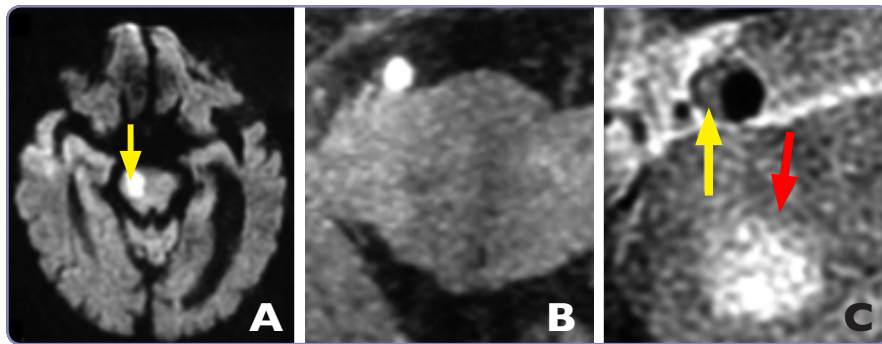
### **1.2.2.3. Desarrollo de nuevos métodos diagnósticos**

Como ya se ha indicado, los métodos angiográficos anteriormente descritos únicamente evalúan la luz arterial. Esto conlleva dos problemas: el primero, que no nos proporcionan información sobre las características de la placa de ateroma y su vulnerabilidad o riesgo de complicación; el segundo, que obvian la existencia de placas de ateroma no estenóticas, hecho que ocurre con frecuencia en las fases iniciales de la aterogénesis debido al remodelado arterial positivo compensatorio.

En los últimos años se han publicado resultados prometedores de nuevas técnicas de imagen para el estudio de las características de las placas intracraneales *in vivo*. Esto constituye un gran logro dado que el estudio histológico de la aterosclerosis intracraneal y de la vulnerabilidad de las placas intracraneales se limita a estudios de autopsias al no existir material quirúrgico accesible<sup>59,60</sup>. Por un lado, se han publicado algunos hallazgos de estudios con ultrasonografía intravascular (IVUS) similar a los realizados en arterias coronarias<sup>61</sup>, aunque éstos son estudios invasivos y la disposición y anatomía de la vasculatura arterial intracraneal dificulta la navegación de las sondas ecográficas<sup>62</sup>. Por otro lado, cada vez son más los estudios no invasivos con resonancia magnética de alta definición que exploran las características de la pared arterial y la placa intracraneal. En animales, los cambios en la pared de la aorta observados en las imágenes de RM se han correlacionado muy bien con los hallazgos histológicos<sup>63</sup> (Figura 4, apartado 1.1.3). En humanos, se han descrito diferentes características de las placas intracraneales en lesiones sintomáticas y asintomáticas<sup>64,65</sup> y se ha demostrado su utilidad en el estudio de lesiones ateroscleróticas no estenosantes en las que los estudios angiográficos no habían evidenciado patología alguna<sup>66,67</sup> (Figura 10).

Durante muchos años las estenosis intracraneales se han considerado lesiones relativamente estables con placas de características predominantemente fibrosas y constrictivas, produciendo eventos isquémicos mayoritariamente en relación a un mecanismo hemodinámico (insuficiente aporte sanguíneo). Sin embargo, los nuevos métodos diagnósticos descritos han demostrado que las placas de ateroma intracraneales se comportan de manera similar a las extracraneales, habiéndose detectado hemorragias intraplaca en relación a la fase sintomática de la aterosclerosis intracraneal<sup>61,65,68</sup> así como un mayor remodelado positivo en el lugar de la lesión produciendo una dilatación arterial compensatoria<sup>64</sup>.

Por tanto, las estenosis intracraneales se muestran como lesiones dinámicas y complicadas, con alto riesgo de trombosis y hemorragia en el seno de las mismas, favoreciendo así también el desarrollo de eventos isquémicos distales a la lesión por un mecanismo atero-embólico. Este mecanismo de isquemia está apoyado por la detección de microembolias mediante Doppler transcraneal en el seno de las estenosis intracraneales sintomáticas y por el frecuente hallazgo de lesiones cerebrales isquémicas múltiples en el lecho distal a las mismas <sup>69</sup>.



**Figura 10:** Imágenes de Resonancia Magnética del mismo paciente.

(**A**): infarto en el tronco cerebral (**flecha**); (**B**): imagen de ARM convencional donde no se observa alteración de la luz arterial de la arteria basilar (**blanco**); (**C**): imagen de RM de alta definición (HRMR) donde se aprecia engrosamiento de la pared de la arteria basilar (**flecha amarilla**) correspondiente con una placa de ateroma, que es muy probablemente la causante del infarto (**flecha roja**) al ocasionar la oclusión de una perforante.

*Amarenco, 2005.*

### 1.2.3. Impacto sociosanitario de la aterosclerosis intracraneal

El impacto sociosanitario de la aterosclerosis intracraneal se basa fundamentalmente en su condición potencial de causar un ictus isquémico cerebral, en su posible relación con el desarrollo de deterioro cognitivo y en su relación con la presencia de aterosclerosis a otros niveles.

#### 1.2.3.1. Ictus isquémico y aterosclerosis intracraneal sintomática

Son bien conocidas las devastadoras consecuencias de la enfermedad cerebral vascular en nuestra población. En España, la incidencia anual de ictus es de 150-200 casos por cada 100.000 habitantes y año, y la prevalencia se sitúa entre 500 y 600 personas por cada 100.000 habitantes. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en 2010 el ictus fue la tercera causa de mortalidad en hombres (tras la cardiopatía isquémica y el cáncer de pulmón) y la primera causa de mortalidad en mujeres, así como es la primera causa de discapacidad a largo plazo en ambos sexos.

El ictus isquémico constituye un 80 - 85% de la totalidad de los ictus (siendo el resto ictus de naturaleza hemorrágica). De éstos, aproximadamente un 6 - 10% son consecuencia directa de la aterosclerosis intracraneal en población caucásica<sup>70-73</sup> y hasta un 50% en poblaciones asiáticas<sup>74,75</sup>. Esto hace que la aterosclerosis intracraneal sea posiblemente la principal causa de ictus isquémico a nivel mundial<sup>76</sup>, por lo que la profundización en el estudio de esta patología se hace imprescindible en nuestros días. En el siguiente capítulo desarrollaremos con más detalle la epidemiología, factores de riesgo, evolución y tratamiento de la aterosclerosis intracraneal sintomática.

### **1.2.3.2. Deterioro cognitivo y aterosclerosis intracraneal**

La demencia es una importante causa de morbimortalidad e incapacidad en los pacientes mayores de 65 años, y su prevalencia tiende a aumentar de la misma manera que lo hace la esperanza de vida de nuestra población. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente y la primera causa de demencia en nuestra población, seguida de la demencia de origen vascular, secundaria al desarrollo de lesiones isquémicas múltiples y progresivas, muchas veces subclínicas en la fase aguda. En muchas ocasiones los dos tipos de deterioro cognitivo se unen en el concepto de demencia mixta. Según los datos de 2010 proporcionados por el INE, la demencia y la enfermedad de Alzheimer constituyeron la sexta y séptima causas de muerte en números absolutos en la población general española, habiendo aumentado el número de defunciones por estas causas respecto a años anteriores.

La relación de los factores de riesgo vascular con el desarrollo de la denominada demencia vascular ha sido ampliamente explorada, siendo clásicamente la EA esporádica considerada únicamente secundaria a cambios neurodegenerativos en relación con el depósito de sustancia amiloide en el cerebro. Sin embargo, múltiples trabajos recientes relacionan el desarrollo de EA con factores de riesgo vascular como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus o con el síndrome metabólico<sup>77,78</sup>. Existen trabajos además que relacionan de forma directa la aterosclerosis intracraneal con el desarrollo de EA, favoreciendo la primera el depósito posterior de sustancia amiloide y condicionando una mayor hipoperfusión cerebral<sup>79-82</sup>. Asimismo, la aterosclerosis intracraneal se ha asociado con sustratos radiológicos estrechamente relacionados con el deterioro cognitivo, como la leucoaraiosis<sup>83</sup>. Recientemente la American Heart Association y la American Stroke Association (AHA/ASA) han publicado un amplio y valioso informe

dedicado a las contribuciones de los factores de riesgo vascular y la patología cerebral vascular en el desarrollo de deterioro cognitivo de cualquier causa<sup>84</sup>.

### **1.2.3.3. Aterosclerosis intracraneal y su relación con la aterosclerosis a otros niveles**

Ya se ha comentado ampliamente en la primera parte de la introducción que la aterosclerosis es una enfermedad sistémica y que, aunque puede desarrollarse con más agresividad o premura en una determinada localización, generalmente va asociada a la existencia de lesiones ateroscleróticas en otras zonas del árbol arterial. Aunque es habitual que inicialmente sólo se manifieste en uno de ellas, permaneciendo asintomático el resto, hemos de tener en cuenta el riesgo individual del paciente que presenta un evento isquémico coronario, cerebral o periférico, de sufrir enfermedad aterosclerótica a otros niveles en el futuro.

La frecuente coexistencia de aterosclerosis intracraneal y carotídea ha sido descrita en diversas poblaciones<sup>85,86</sup>. También hay varios trabajos que reportan una gran asociación de la aterosclerosis intracraneal con la enfermedad coronaria asintomática. Así, en un grupo de pacientes estudiados en Japón tras sufrir un infarto cerebral, y sin antecedentes de cardiopatía isquémica, se detectó mediante angiografía por tomografía computerizada que un 37.5% presentaban enfermedad coronaria asintomática, hecho que se asoció además de forma significativa a la coexistencia de aterosclerosis intracraneal<sup>87</sup>. En nuestro medio, más del 50% de los pacientes con estenosis intracraneales sintomáticas presentaron isquemia miocárdica silente detectada por SPECT miocárdico de esfuerzo<sup>88</sup>. En Francia, el estudio PRECORIS volvió a poner de manifiesto la elevada prevalencia de enfermedad coronaria asintomática en pacientes con ictus isquémico, especialmente en aquellos que presentaban aterosclerosis a nivel cervicocerebral<sup>89</sup>. También se ha relacionado la existencia de un índice tobillo-brazo alterado (marcador de arteriopatía periférica) con la presencia de aterosclerosis a nivel cervical y cerebral en pacientes con ictus isquémico<sup>90,91</sup>.

Por tanto, la aterosclerosis intracraneal sintomática podría considerarse un marcador de aterosclerosis a otros niveles como el extracraneal, carotídeo, coronario o de la circulación periférica. La búsqueda de aterosclerosis subclínica en otras localizaciones podría permitir aplicar medidas preventivas más específicas o agresivas con el fin de intentar evitar la progresión de dichas lesiones o la aparición de manifestaciones clínicas a cualquier nivel.

### I.3. ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL SINTOMÁTICA

#### I.3.1. Epidemiología: importancia de la raza y de los factores de riesgo vascular

Existe una gran diferencia en la distribución racial de la patología aterosclerótica cerebral. Estudios comparativos anatómo-patológicos han reportado una mayor prevalencia de aterosclerosis extracraneal (carótidas internas y vertebrales) en población caucásica, mientras que en los individuos de raza negra y en especial los de origen asiático, la aterosclerosis afecta con más frecuencia a los vasos intracraneales<sup>92-94</sup>. Recientemente se ha reportado un estudio anatómo-patológico en Francia, con mayoría de sujetos blancos, realizado en 259 sujetos fallecidos por un ictus isquémico y en 80 por un ictus hemorrágico (grupo control). Encontraron una alta prevalencia de estenosis intracraneales (definidas como cualquier placa de ateroma que ocasiona una reducción de la luz arterial mayor al 30%), siendo significativamente más frecuentes en el grupo de ictus isquémico respecto a los controles (43.2% vs 17.8%). Las estenosis intracraneales se consideraron las causantes del ictus isquémico en el 5.8% de los casos y se asociaron a su presencia el sexo masculino y la diabetes<sup>95</sup>. En este estudio, la prevalencia de placas intracraneales (sin tener en cuenta el grado de reducción de la luz) fue del 62.2% en el grupo de sujetos fallecidos por un ictus isquémico. El desarrollo de técnicas no invasivas para la detección de la aterosclerosis intracraneal ha permitido estudiar su implicación causal en numerosas poblaciones con ictus isquémico, confirmando las diferencias encontradas en los estudios necrópsicos. En Asia la aterosclerosis intracraneal es considerada la causa más importante de ictus isquémico<sup>75,96</sup>, habiéndose encontrado también una alta incidencia de aterosclerosis intracraneal sintomática en la raza negra afro-americana y en sujetos de ascendencia hispana<sup>72,97</sup>. En población caucásica, la aterosclerosis intracraneal causa un 6-10% de todos los ictus isquémicos, como hemos comentado anteriormente. Diferencias genéticas, ambientales, en estilo de vida y en los factores de riesgo vascular se han apuntado como el posible origen de esta disparidad, aunque los mecanismos básicos relacionados con la diferente distribución racial de la aterosclerosis intracraneal no están aún bien esclarecidos.

Dentro de la misma raza, existen también diferencias en la localización extra o intracraneal de las lesiones ateroscleróticas. Como ya se ha comentado en el *punto 1.2.1*, las arterias intracraneales poseen algunas particularidades anatómicas, hemodinámicas y moleculares que las diferencian del resto de

arterias sistémicas y por tanto podrían tener una respuesta distinta ante los mismos factores aterogénicos. En general se considera aceptado que la aterosclerosis intracraneal se desarrolla a edades más tardías que la extracraneal en todas las poblaciones. Además, en los últimos años se ha descrito la frecuente asociación entre algunos factores de riesgo vascular y la existencia de estenosis intracraneales sintomáticas en pacientes con ictus isquémico. En este sentido, la diabetes y el síndrome metabólico, el cual viene definido por la asociación de factores de riesgo como la obesidad, hiperglicemia, dislipemia e hipertensión arterial, y que tiene como sustrato patológico una resistencia insulínica de base, son factores de riesgo que parecen tener una especial implicación en el desarrollo de aterosclerosis a nivel intracraneal, en comparación con la localización extracraneal <sup>70,98-101</sup>.

### **1.3.2. Pronóstico y progresión de las lesiones**

La aterosclerosis intracraneal sintomática se considera una enfermedad con alto riesgo de recurrencia de eventos isquémicos, tanto en el territorio cerebral irrigado por la arteria afectada como en otros lechos vasculares. El estudio norteamericano WASID, se diseñó para comparar la eficacia del tratamiento con aspirina (antiagregación) versus warfarina (anticoagulación) en la prevención secundaria de pacientes con un primer ictus isquémico debido a aterosclerosis intracraneal. Se incluyeron 569 pacientes con estenosis intracraneales superiores al 50%, de los cuales 106 (19%) presentaron un nuevo ictus isquémico tras una media de 1.8 años de seguimiento, ocurriendo la mayoría (73%) en el territorio de la arteria afectada inicialmente <sup>102</sup>. De los ictus isquémicos ocurridos fuera del territorio de dicha arteria, la mitad se atribuyeron a una estenosis intracraneal en diferente localización <sup>103</sup>. La gravedad basal de la estenosis (estenosis iguales o superiores al 70%) se consideró uno de los predictores más importantes de ictus recurrente en el mismo territorio (riesgo del 18% anual frente al 6% en los pacientes con estenosis < 70%) <sup>104</sup>. Además, la recurrencia temprana (en los tres primeros meses tras el ictus inicial) fue alta, sobre todo en el grupo de pacientes que inicialmente habían debutado con un ataque isquémico transitorio (AIT) <sup>105</sup>. También encontraron más riesgo de ictus recurrente en el sexo femenino <sup>106</sup>, en la raza negra <sup>107</sup>, y en aquellos pacientes que cumplían criterios para el síndrome metabólico <sup>108</sup>. En Francia, el estudio GESICA incluyó prospectivamente 102 pacientes con ictus debido a aterosclerosis intracraneal, reportando un riesgo de recurrencia de ictus a los dos años del 38% y de otros eventos cardiovasculares del 18.6% <sup>109</sup>. En China, en una cohorte de 705 pacientes con ictus isquémico, los



pacientes con estenosis intracraneales presentaron un mayor riesgo de ictus recurrente al año respecto a los que no tenían estenosis intracraneales (17.1% frente al 10%), y este riesgo fue mayor en el grupo de pacientes que presentaban estenosis extra e intracraneales simultáneamente (24.3%)<sup>110</sup>. Recientemente, en un estudio francés que incluyó 1.881 pacientes con accidente isquémico transitorio (AIT), se detectaron estenosis intracraneales en el estudio inicial en un 8.8%, considerándose sintomáticas (causantes del AIT) un 3.7%. Este subgrupo de pacientes con estenosis intracraneales presentó una tasa de eventos vasculares al año de seguimiento (ictus, cardiopatía isquémica y/o muerte de origen vascular) significativamente mayor que los pacientes que no presentaban estenosis intracraneales en el estudio inicial<sup>111</sup>. En España, en una serie de 40 pacientes con aterosclerosis intracraneal sintomática seguidos durante una media de 26 meses, se reportó una recurrencia de ictus o AIT en el mismo territorio en el 20% de los casos y de cardiopatía isquémica en el 12.5%. El riesgo de recurrencia se asoció de forma independiente con la progresión en la gravedad de las estenosis detectada por Doppler transcraneal durante el seguimiento<sup>112</sup>. Resultados similares se obtuvieron en una cohorte de pacientes en China seguidos durante 6 meses: los pacientes que mostraron progresión de las lesiones tenían más riesgo de recurrencia<sup>113</sup>.

Las estenosis intracraneales ateroscleróticas son por tanto lesiones dinámicas, capaces de progresar o incluso regresar a lo largo del tiempo, independientemente de su expresión clínica<sup>114</sup>. En un estudio reciente utilizando angioRM en un seguimiento medio de 151 pacientes con aterosclerosis intracraneal durante 14 meses, se determinó un 15.2% de progresión de las lesiones (empeoramiento de la estenosis, oclusión o aparición de nuevas estenosis) y un 10% de regresión de las mismas. A la progresión se asoció de forma estadísticamente significativa la presencia de diabetes y el tabaquismo activo<sup>115</sup>.

Por tanto, la aterosclerosis intracraneal sintomática es una enfermedad dinámica y agresiva con alto riesgo de recurrencia a pesar del tratamiento, en el cual profundizaremos más adelante. Por ello, es importante estudiar los factores clínicos y biológicos que se asocian a su presencia y evolución, con el fin de desarrollar estrategias preventivas más específicas.

### **I.3.3. Biomarcadores circulantes relacionados con su presencia y progresión**

Como hemos comentado con anterioridad, en los últimos años múltiples trabajos se han centrado en buscar biomarcadores circulantes que nos ayuden en la detección de sujetos en riesgo de sufrir eventos aterotrombóticos en el futuro así como marcadores de progresión de la aterosclerosis. En este sentido, la mayoría de trabajos publicados se han centrado en la cardiopatía isquémica y en la patología carotídea, mientras que el estudio de biomarcadores asociados a la presencia y progresión de la aterosclerosis intracraneal sintomática ha sido mucho menos exhaustivo.

En nuestro medio, los niveles basales de proteína C reactiva (PCR) predijeron la aparición de nuevos eventos isquémicos cerebrales y coronarios en el año posterior al ictus en un grupo de pacientes con aterosclerosis intracraneal sintomática <sup>116</sup>. Apoyando estos resultados, detectaron más adelante que la presencia del polimorfismo C1444T en el gen de la PCR, el cual interviene en regular los niveles de PCR circulantes, también se comportó como predictor de eventos vasculares <sup>117</sup>. El mismo grupo evaluó la progresión de las lesiones intracraneales sintomáticas tras un seguimiento medio de 23 meses en relación a un amplio panel de marcadores séricos de inflamación-aterosclerosis (PCR, lipoproteína (a), varias metaloproteinasas de matriz -MMP-, E-selectina, moléculas de adhesión leucocitaria, inhibidor del activador del plasminógeno PAI-I). La progresión de las estenosis intracraneales ocurrió en un 33% de los pacientes y se asoció, de forma independiente a los factores de riesgo vascular, a la presencia de un estado proinflamatorio basal así como a una alteración en el sistema fibrinolítico endógeno, siendo la PCR y el PAI-I las moléculas que predijeron esta progresión de forma independiente al resto de marcadores. La progresión de las lesiones fue acompañada de un mayor riesgo de sufrir eventos vasculares durante el seguimiento, considerándose por tanto esos biomarcadores potencialmente útiles en la práctica clínica <sup>118</sup>. Recientemente en Japón se ha publicado un estudio similar en el que evaluaron la progresión de las estenosis intracraneales mediante ARM tras una media de 3 años. Se midieron basalmente los niveles de PCR, Interleuquina-6 (Il-6), Il-18, factor de necrosis tumoral-alfa y metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9. La progresión de las lesiones, ocurrida en 12.5% de los pacientes, se asoció de forma significativa a los niveles basales de Il-6 <sup>119</sup>.

Además de los biomarcadores predominantemente “inflamatorios”, se han descrito algunos marcadores “metabólicos” en relación a la aterosclerosis intracraneal sintomática. En nuestro medio, niveles elevados de lipoproteína (a) así como el antecedente de diabetes fueron marcadores de una mayor extensión basal de la aterosclerosis intracraneal sintomática<sup>70</sup>. Más tarde el mismo grupo reportó que niveles basales altos en la actividad de la lipoproteína asociada a la fosfolipasa A2 (una molécula pro-inflamatoria que interviene en el metabolismo del LDL), se asociaban a una mayor recurrencia clínica (cerebral o coronaria) en una serie de 75 pacientes seguidos durante 2 años<sup>120</sup>. Como ya hemos comentado en el capítulo anterior, el síndrome metabólico parece estar estrechamente relacionado con la presencia de aterosclerosis intracraneal sintomática, y parece además conferirle un peor pronóstico<sup>108</sup>. El síndrome metabólico constituye una entidad que engloba varios factores de riesgo (obesidad, niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de HDL, hipertensión e hiperglicemia en ayunas) y cuyos efectos aterogénicos están mediados fundamentalmente por una resistencia insulínica de base<sup>121</sup>. La resistencia insulínica medida a través del índice HOMA<sup>122</sup> se ha relacionado también directamente con la aterosclerosis intracraneal sintomática en un grupo de pacientes no diabéticos<sup>100</sup>. En la misma línea, niveles bajos de adiponectina, que es una proteína anti-aterogénica relacionada inversamente con la obesidad y la resistencia insulínica, se han asociado a la aterosclerosis intracraneal sintomática en un estudio desarrollado en Corea<sup>123</sup>. También en Corea, se han encontrado niveles altos del índice Apo-lipoproteína B/Apo-lipoproteína AI (ApoB/AI ratio) asociados con la existencia de estenosis intracraneales en un grupo de pacientes con ictus isquémico así como con la presencia de síndrome metabólico<sup>124</sup>. En Francia, en un grupo de pacientes que se presentaron con un ataque isquémico transitorio (AIT) o ictus isquémico leve, la llamada dislipemia aterogénica (definida por niveles de HDL < 40 y niveles de triglicéridos  $\geq$  150 mg/dl) se asoció de forma significativa a la presencia de estenosis intracraneales sintomáticas<sup>125</sup>.

Por tanto, se han descrito diversos biomarcadores circulantes (inflamatorios y metabólicos) relacionados con la presencia y progresión de la aterosclerosis intracraneal sintomática, aunque muchos de estos estudios pecan de tamaños muestrales pequeños y los resultados no han sido replicados en diferentes poblaciones. Desconocemos por el momento si alguno de estos marcadores se encuentra asociado a la presencia de aterosclerosis intracraneal asintomática o a la conversión de la aterosclerosis asintomática en sintomática.

### I.3.4. Prevención secundaria. Cuestiones abiertas

En cuanto a la elección del tratamiento más adecuado en la prevención secundaria en aquellos pacientes que han sufrido un primer ictus atribuido a la existencia de aterosclerosis intracraneal, existen aún algunos frentes abiertos.

Por un lado, el estudio WASID<sup>102</sup> comparó la eficacia de la warfarina (anticoagulante) con la de la aspirina (antiagregante) en estos pacientes y fue parado prematuramente porque en el grupo asignado a warfarina las complicaciones hemorrágicas y la mortalidad fueron mayores. Desde el desarrollo de este estudio, y dada la alta tasa de recurrencia en cualquiera de los dos grupos de tratamiento, en especial aquellos con una mayor gravedad de las estenosis intracraneales (estenosis  $\geq 70\%$ ), se han publicado numerosas series de casos utilizando tratamientos endovasculares mediante cateterismo selectivo de las arterias afectadas con utilización de angioplastia (dilatación del vaso normalmente con un balón expandible) y/o colocación de *stents* intracraneales (dispositivos que permiten comprimir la placa de ateroma contra la pared desde el interior del vaso, aumentando el diámetro de la luz). Estos tratamientos endovasculares son similares a las técnicas empleadas en la revascularización coronaria o carotídea. Sin embargo, no fue hasta el pasado año cuando se publicaron los datos del único estudio randomizado que comparó el tratamiento endovascular (*stenting* intracraneal) frente al mejor tratamiento médico en pacientes con estenosis intracraneales sintomáticas mayores del 70% (estudio SAMMPRIS). Para igualar los dos brazos de tratamiento, todos los pacientes recibieron doble antiagregación (aspirina + clopidogrel) en los primeros tres meses tras el ictus para posteriormente continuar únicamente con aspirina. Además, como novedad respecto al estudio WASID, se realizó un control estricto de los factores de riesgo vascular y se administraron estatinas para conseguir unos niveles de LDL-colesterol inferiores a 70 mg/dl<sup>126,127</sup>. Los resultados del estudio no han sido los esperados por muchos. El estudio tuvo que ser parado prematuramente tras la inclusión de 451 pacientes porque la tasa de eventos (ictus isquémico o muerte) a los 30 días fue alarmantemente mayor en el brazo de tratamiento endovascular (*stenting*) (14.7% en el grupo de *stenting* frente al 5.5% en el grupo de tratamiento médico). La tasa de ictus isquémico en el mismo territorio al año fue del 20% en el grupo de *stenting* y del 12.2% en el grupo de tratamiento médico. Este estudio, aunque metodológicamente impecable, ha recibido no pocas críticas<sup>128</sup> y son muchos los especialistas que abogan por el estudio de otras intervenciones endovasculares, utili-

zando otros tipos de stent, ya que en el estudio SAMMPRIS se utilizó sólo un dispositivo, el *Wingspan*, que es el único hasta ahora aprobado por la FDA con esta indicación. Otros han propuesto diseñar estudios para evaluar la eficacia de la angioplastia sola, sin colocación de stent, la cual únicamente ha sido evaluada en estudios retrospectivos <sup>129</sup>. Lo que parece claro para todos es que la tasa anual de recurrencias en el brazo de tratamiento médico, aun tratándose de un tratamiento agresivo con control estricto de los factores de riesgo, sigue siendo alta (12.5%). Estos resultados por tanto, apoyan el continuo y exhaustivo estudio de esta patología para implementar los tratamientos preventivos, quizá desde un estadio más precoz.

Por otro lado, existen dos estudios en los que se ha evaluado el tratamiento antiagregante doble en las estenosis intracraneales sintomáticas. En uno de ellos, el estudio CLAIR, se demostró la mayor eficacia de la doble antiagregación (aspirina + clopidogrel) frente a la antiagregación simple (aspirina) en la disminución de señales de alta intensidad (HITS) detectadas por Doppler transcraneal (y correspondientes a microembolias desprendidas de la placa) <sup>130</sup>. Sin embargo, este estudio no se diseñó para evaluar la eficacia en la disminución de recurrencias vasculares en ambos grupos, por lo que no pueden sacarse conclusiones a este respecto. Otro estudio evaluó dos tipos de doble antiagregación (aspirina + clopidogrel frente a aspirina + cilostazol) en 457 pacientes con estenosis intracraneales sintomáticas sin encontrar diferencias ni en el número de eventos vasculares (evaluados a los 7 meses) ni en la progresión o regresión de las lesiones (evaluado a los 7 meses con una ARM de control) entre los dos grupos de tratamiento <sup>131</sup>. Hasta la fecha no existe ningún ensayo clínico que compare el tratamiento con aspirina solo frente al tratamiento antiagregante doble, y de hecho, se desconoce si en el estudio SAMMPRIS la doble antiagregación utilizada en los primeros 90 días podría haber influido favorablemente en la baja tasa de eventos ocurridos en los primeros 30 días en el brazo de tratamiento médico (5.8% frente a 10.2% reportados en el estudio WASID en sujetos con similares características).

Por tanto, el campo de la prevención secundaria en la aterosclerosis intracraneal sintomática necesita aún muchos estudios que ayuden a establecer cuál es la mejor estrategia preventiva para estos pacientes y para intentar reducir la alta tasa de recurrencia que presentan.

## I.4. ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL ASINTOMÁTICA

### I.4.1. Epidemiología y factores de riesgo vascular

La aterosclerosis intracraneal en su estadio preclínico, antes de dar lugar a un ictus isquémico, está pobremente estudiada en nuestro medio, a diferencia de la aterosclerosis carotídea asintomática, cuya prevalencia ha sido reportada recientemente en base a los resultados de varios estudios poblacionales <sup>132</sup>. Dado que es la principal causa de ictus isquémico en poblaciones asiáticas, es en este continente donde se han desarrollado la mayoría de los estudios de prevalencia de aterosclerosis intracraneal en sujetos asintomáticos, como veremos a continuación.

#### *I.4.1.1. Estudios de prevalencia en poblaciones asiáticas*

##### **Estudios utilizando Doppler transcraneal (DTC)**

En el sur de China se ha reportado una prevalencia del 5.9% de estenosis de la arteria cerebral media (ACM) entre 1.068 sujetos asintomáticos mayores de 50 años. Los factores de riesgo relacionados de forma independiente fueron el sexo masculino, la hipertensión arterial, la edad y la diabetes mellitus <sup>133</sup>. En Hong Kong estudiaron 3057 sujetos con una edad media de 56 años y al menos un factor de riesgo vascular, estimando una prevalencia global de estenosis de la ACM del 12.6%, el doble que en el estudio anterior, en el cual los pacientes participantes podían no tener ningún factor de riesgo vascular. Teniendo en cuenta los factores de riesgo (edad, HTA, dislipemia, DM), la prevalencia aumentaba progresivamente desde 7.2% en la población con un solo factor de riesgo, hasta 29.6% en la población que asociaba 4 factores de riesgo <sup>134</sup>. También en Hong Kong, se estudiaron 2.165 pacientes diabéticos tipo 2 sin historia previa de enfermedad cerebrovascular, estimándose una prevalencia de estenosis de la arteria cerebral media (ACM) del 20.1%. Se asociaron a la presencia y mayor extensión de las lesiones (determinada como la presencia de estenosis en ambas ACM), la edad, la duración de la diabetes, la hipertensión arterial, las cifras de colesterol, la presencia de retinopatía diabética y la arteriopatía periférica medida según el índice tobillo-brazo. En el análisis de regresión logística se comportaron como predictores independientes de la presencia de estenosis intracraneales la edad, la glicemia basal, la hipertensión y las cifras de LDL-colesterol <sup>135</sup>. En Corea, en un estudio que incluyó a 1208 pacientes asintomáticos mayores de 40 años, se detectó una prevalencia de aterosclerosis intracraneal del 24.5%,

asociándose de nuevo de forma significativa la edad, la hipertensión y la diabetes mellitus. En este estudio se evaluaron todas las arterias intracraneales (en los previos, sólo la ACM). La arteria cerebral más frecuentemente afectada fue la ACM, seguida de la arteria basilar<sup>136</sup>. También en Corea se ha reportado recientemente la asociación del índice triglicéridos/HDL con la presencia de estenosis en la arteria basilar en sujetos asintomáticos<sup>137</sup>.

### **Estudios utilizando Angiografía por Resonancia Magnética (ARM)**

Existen 2 estudios retrospectivos en sujetos sin historia de ictus a los que se les realizó una ARM en contexto de otros motivos, en el que se reporta la frecuencia de la presencia de estenosis intracraneales. Sin embargo estos estudios carecen de la metodología propia de un estudio poblacional de prevalencia. En Japón, se estudiaron con ARM 425 sujetos de edades comprendidas entre 33 y 90 años encontrándose un 9.6% de individuos con estenosis en la carótida interna intracraneal, 6.4% en la ACM, 3.8% en la arteria vertebral y 2.1% en la arteria basilar<sup>138</sup>. En Corea, las ARM de 835 sujetos con edades entre 29 y 85 años revelaron estenosis intracraneales asintomáticas en un 3% y sólo en un 0.5% se apreciaron estenosis extracraneales significativas<sup>139</sup>.

#### **1.4.1.2. Falta de estudios de prevalencia en poblaciones caucásicas**

En la actualidad no existe ningún estudio de base poblacional que determine la prevalencia de la aterosclerosis intracraneal asintomática o subclínica en población caucásica.

En un laboratorio de neurosonología norteamericano reportaron un 12.9% de sujetos con estenosis intracraneales entre 510 pacientes (media de edad de 71 años) que habían sido derivados tras el hallazgo de un soplo carotídeo. La presencia de estenosis intracraneales se asoció al antecedente de diabetes y de cardiopatía isquémica<sup>140</sup>.

Las únicas series largas en las que se reporta la frecuencia de estenosis intracraneales asintomáticas en población caucásica están constituidas por pacientes que habían sufrido un evento isquémico cerebral. Por un lado, en 2010, en Francia se reportó la prevalencia de estenosis intracraneales detectadas por DTC entre 1823 pacientes que presentaron un ataque isquémico transitorio (AIT) cerebral. Se encontraron estenosis intracraneales en un 8.8% de pacientes en total, considerándose un 3.7% estenosis

sintomáticas (es decir, causantes del AIT). Por tanto, en este grupo de pacientes, un 5.1% presentaba estenosis intracraneales asintomáticas (que no habían dado lugar a un ictus isquémico). La mayoría de las lesiones se encontraron en la circulación anterior, y se asociaron a su presencia la edad, la diabetes y la hipertensión. Un 31% de los pacientes con estenosis intracraneales presentaban además estenosis carotídeas  $\geq 50\%$ <sup>111</sup>. Por otro lado, en Holanda se publicó recientemente un trabajo que reporta la prevalencia de estenosis intracraneales detectadas por angiografía por tomografía computerizada (ATC) en una cohorte de 786 pacientes con ictus isquémico o AIT. Encontraron estenosis intracraneales (definidas como una reducción de la luz  $\geq 30\%$ ) en un 23% de los pacientes, y se consideraron sintomáticas en un 8%. Por tanto, un 15% de pacientes presentaban estenosis intracraneales asintomáticas. En este caso fueron más frecuentes las estenosis de circulación posterior. Los factores que se asociaron de forma independiente a la presencia de estenosis intracraneales fueron la edad, el sexo masculino, la hipertensión, la diabetes y la velocidad de sedimentación glomerular (VSG). Entre los pacientes con estenosis intracraneales, un 21% presentaban estenosis carotídeas extracraneales  $\geq 50\%$ , significativamente mayor al 8% de estenosis carotídeas encontradas en el grupo sin estenosis intracraneales<sup>141</sup>.

Por tanto, los escasos estudios que reportan la frecuencia de aterosclerosis intracraneal asintomática en población caucásica se han desarrollado en grupos de pacientes con antecedentes de ictus isquémico. No existen hasta el momento estudios poblacionales que nos permitan conocer la prevalencia de la aterosclerosis intracraneal en nuestro medio ni los marcadores clínicos o biológicos que se asocian a la presencia de estas lesiones. Es este sentido, nuestro trabajo pretende dar luz a este vacío de conocimiento acerca de la aterosclerosis intracraneal asintomática en población caucásica.

#### **1.4.2. Pronóstico y progresión de las lesiones asintomáticas**

Los estudios asiáticos de base poblacional citados anteriormente no han reportado un seguimiento longitudinal a largo plazo en el que se evalúe el riesgo de aparición de eventos cardiovasculares en aquellos sujetos que presentaban estenosis intracraneales asintomáticas al inicio. En Asia, existen algunos trabajos retrospectivos y de series de casos que comentaremos a continuación. En China, se evaluó de forma retrospectiva la mortalidad en un grupo de 2197 sujetos diabéticos tipo 2 a los que se les había realizado un estudio neurosonológico cerebral en la consulta de Endocrinología. 272 sujetos (12.3%) presen-



taban estenosis intracraneales en el estudio basal. Acontecieron 191 muertes tras una media de 8 años de seguimiento desde la visita basal, 31% de ellas de origen vascular. La presencia de estenosis intracraneales asintomáticas se comportó como un predictor independiente de muerte de origen vascular, tras el ajuste por el resto de factores de riesgo vascular y variables antropométricas y bioquímicas <sup>142</sup>. También en China, siguieron la evolución de 200 sujetos sin antecedentes de ictus y que presentaban estenosis intracraneales asintomáticas en la ACM detectadas en un laboratorio de neurosonología. Durante un seguimiento medio de 3 años, reportaron una baja tasa de eventos cerebrovasculares (3.8%) en estos pacientes. La presencia de diabetes y de placas carotídeas se asoció significativamente a la aparición de un evento cerebral isquémico durante el seguimiento. En este estudio no se reportan ni la tasa de eventos vasculares a otros niveles ni la mortalidad <sup>143</sup>. En un ensayo clínico realizado en China, se comparó el efecto de la administración de estatinas frente a la de placebo en la progresión o regresión de estenosis intracraneales asintomáticas que afectaban a la ACM. Incluyeron a 227 pacientes y evaluaron el grado de estenosis por ARM en la visita basal y a los 2 años, así como la aparición de eventos vasculares. Por un lado, no hubo diferencias en la proporción de pacientes en los que se detectó progresión ( 6%) o regresión ( 16%) de las estenosis entre ambos grupos de tratamiento. Por otro lado, la tasa de eventos vasculares en la totalidad del estudio fue baja: 8 ictus (3, 5%), 5 eventos cardíacos y 4 muertes de origen vascular. Sólo se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento en la mortalidad total (mayor en el grupo placebo) <sup>144</sup>.

En población caucásica existen dos series de casos que evalúan el pronóstico de la aterosclerosis intracraneal asintomática, ambas desarrolladas en Alemania. En el primer estudio, se reporta el seguimiento medio de 815 días en 50 pacientes con estenosis intracraneales asintomáticas en la ACM detectadas por dúplex transcraneal. No aconteció ningún evento isquémico cerebral ipsilateral a la lesión y sólo un AIT contralateral, y se produjeron 3 fallecimientos (1 hematoma subdural y dos de origen no vascular) <sup>145</sup>. De estos pacientes, casi el 50% habían presentado isquemia cerebral en un territorio cerebral diferente al detectado como estenótico previo a la inclusión y además el 84% y el 44% de los pacientes recibían terapia antitrombótica y estatinas respectivamente en el momento de la inclusión. Estos datos son por tanto difícilmente extrapolables a la realidad de la historia natural de la enfermedad aterosclerótica asintomática en población caucásica. En el segundo estudio, los autores siguieron la evolución de 102

pacientes con estenosis intracraneales en la ACM, de los cuales 46 pacientes tenían estenosis sintomáticas y 56 asintomáticas. En un seguimiento medio de 2,5 años, ocurrieron 19 eventos isquémicos cerebrales (tasa anual del 7.3% global), la mayoría en el territorio de la arteria afectada. La tasa anual de ictus fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con estenosis sintomáticas (12.3%) que en el de estenosis asintomáticas (2.8%)<sup>146</sup>. En este estudio todos los pacientes seguían tratamiento con antiagregantes (73.5%) o anticoagulantes (26.5%) desde la inclusión. Cabe remarcar además que en las dos series de pacientes alemanes, el grado de las estenosis intracraneales era leve en la mayoría de los pacientes y que no se evaluó la aparición de eventos coronarios en el seguimiento.

Por tanto, existen pocos estudios acerca de la historia natural de la enfermedad aterosclerótica intracraneal, y especialmente en población caucásica. Aunque podría concluirse que la aterosclerosis intracraneal asintomática confiere un bajo riesgo de ictus o de otros eventos cardiovasculares, la diversidad en los métodos y el pobre diseño de los estudios presentados no permite asegurar dicha afirmación. Es además algo sorprendente dada la alta tasa de eventos vasculares reportada en pacientes con aterosclerosis intracraneal sintomática, como hemos comentado ampliamente en el anterior apartado de la introducción.

El impacto pronóstico de la aterosclerosis intracraneal asintomática debería evaluarse en un estudio prospectivo y de base poblacional, comparando la tasa de eventos entre los grupos de pacientes con y sin estenosis intracraneales al inicio. Salvo el estudio que presentaremos en la presente tesis doctoral, no existe hasta la fecha ningún estudio que reúna estas características.

### **1.4.3. Biomarcadores circulantes y aterosclerosis intracraneal asintomática: un campo inexplorado**

Los biomarcadores circulantes pueden estar relacionados con cualquier fase del proceso aterosclerótico, desde la disfunción endotelial, la cascada inflamatoria, la migración celular o la trombogénesis. También pueden estar en relación al metabolismo de los lípidos, que son los principales constituyentes de la placa de ateroma.

El estudio de biomarcadores circulantes se basa por un lado en su potencial uso como predictores para la detección de aterosclerosis subclínica o de un evento clínico en el futuro, sobre todo si alcanzan unas

características determinadas, como son el ser altamente sensibles, específicos, accesibles, estandarizados y costo-efectivos. Por otro lado, el estudio de biomarcadores nos permite realizar una aproximación *in vivo* a la fisiopatología del proceso aterosclerótico, lo cual podría contribuir al desarrollo de estrategias preventivas específicas para cada problema.

Como hemos comentado con anterioridad, los trabajos que estudian el papel de biomarcadores inflamatorios y metabólicos en la progresión y riesgo de recurrencia de la aterosclerosis intracraneal sintomática ya son escasos en comparación a los desarrollados acerca de la aterosclerosis sintomática a otros niveles. Pues aún más, no existen estudios de biomarcadores en relación a la presencia y pronóstico de la aterosclerosis intracraneal asintomática o subclínica en el momento actual, con la excepción de un estudio transversal retrospectivo desarrollado en Japón evaluando la PCR en relación a la presencia de aterosclerosis extra e intracraneal asintomática <sup>147</sup>.

A continuación revisaremos brevemente el papel de algunos marcadores inflamatorios y metabólicos representativos del proceso aterosclerótico global, ya estudiados a otros niveles, y que podrían jugar un papel en la aterosclerosis intracraneal asintomática.

#### **1.4.3.1. Marcador de disfunción endotelial: la dimetil-arginina asimétrica (ADMA)**

La disfunción endotelial es considerada un evento crucial en las fases iniciales de la aterogénesis en general, si bien su papel en la aterosclerosis intracraneal nunca ha sido estudiado. La exposición continuada a los factores de riesgo vascular termina por provocar una pérdida de las propiedades antitrombótica y antiinflamatoria del endotelio vascular, lo que supone el primer paso para el desarrollo de una lesión aterosclerótica. Por ser éste un proceso que sucede precozmente en la aterogénesis, nos parece especialmente relevante su estudio en individuos asintomáticos expuestos a factores de riesgo vascular. En relación con la disfunción endotelial, en este proyecto nos centraremos en la investigación del papel de la dimetil-arginina asimétrica (ADMA) en la aterogénesis intracraneal. La ADMA es un producto final del metabolismo que actúa como inhibidor endógeno de la enzima óxido nítrico sintasa. La disminución de los niveles de ON provoca disfunción endotelial y favorece el inicio de la aterogénesis. En dos subestudios de la cohorte de Framingham, niveles elevados de ADMA se relacionaron con la presencia de de aterosclerosis subclínica en forma de un GIM carotideo aumentado <sup>148</sup> y con la presencia de infartos

cerebrales silentes<sup>149</sup>. En estudios longitudinales, la ADMA se ha asociado con la progresión de la aterosclerosis y con un mayor riesgo de presentar eventos isquémicos y muerte de origen vascular<sup>150,151</sup>. Además, la ADMA se ha reportado como una molécula capaz de disminuir la sensibilidad insulínica en modelos animales<sup>152</sup>, algo que se ha observado también en sujetos obesos con síndrome metabólico<sup>153</sup>. Se hipotetiza por tanto que la resistencia insulínica está íntimamente asociada con la disfunción endotelial.

#### **1.4.3.2. Marcador inflamatorio: La proteína C reactiva (PCR)**

La PCR es probablemente el biomarcador inflamatorio más estudiado en todas las enfermedades cardiovasculares, tanto en su fase sintomática como asintomática. Es una proteína secretada en el hígado e implicada en muchos aspectos de la aterogénesis y vulnerabilidad de la placa, incluyendo la expresión de moléculas de adhesión, la inducción de la secreción de ON, la alteración del complemento y la inhibición de la fibrinólisis endógena. Los procedimientos para su detección y medida en sangre periférica están estandarizados y ampliamente distribuidos. La PCR es el único biomarcador junto con la lipoproteína asociada a la fosfolipasa-A2 (Lp-PLA2) que se considera útil como método complementario en la determinación del riesgo cardiovascular en la población asintomática<sup>29</sup>. Como ya hemos visto, niveles altos de PCR y la presencia del polimorfismo C1444T en el gen de la PCR se asociaron a la progresión y recurrencia clínica de una cohorte de pacientes con estenosis intracraneales sintomáticas en nuestro medio<sup>116,117</sup>. Desconocemos si los niveles de PCR se asocian a la presencia de aterosclerosis intracraneal asintomática o a su pronóstico en nuestro medio. En un estudio transversal y retrospectivo realizado en Japón, los niveles de PCR fueron similares entre 138 sujetos asintomáticos que presentaban aterosclerosis intracraneal y 435 sujetos sin aterosclerosis (controles), mientras que fueron significativamente más altos que en los controles en 267 sujetos que presentaban aterosclerosis extracraneal<sup>147</sup>.

#### **1.4.3.3. Entre la inflamación y la resistencia insulínica: la resistina**

La resistina es un polipéptido que pertenece a la familia de las proteínas secretoras ricas en cisteína, y que fue inicialmente estudiado en roedores. En éstos, es secretada fundamentalmente en los adipocitos, y tiene un papel fundamental en la obesidad y en la resistencia insulínica. Sin embargo, en humanos la resistina se produce principalmente en células inflamatorias y su papel en la resistencia insulínica y la obesidad es más controvertido. La resistina induce en el endotelio la secreción de moléculas proin-

flamatorias y parece también interferir negativamente en la secreción de ON<sup>154,155</sup>. En 2005 Reilly demostró su papel como marcador de aterosclerosis coronaria subclínica en humanos, de forma independiente a la PCR y a los factores de riesgo vascular<sup>156</sup>. Desde entonces, varios trabajos la han relacionado también con la presencia de aterosclerosis carotídea subclínica<sup>157,158</sup> y con el mal pronóstico a largo plazo en pacientes que habían sufrido un primer ictus aterotrombótico<sup>159</sup>.

#### ***1.4.3.4. Marcador de la inhibición de la fibrinólisis endógena: el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)***

La alteración de la fibrinólisis endógena promueve un estado protrombótico y tiene un gran impacto sobre la génesis y progresión de la aterosclerosis. El PAI-1 es uno de los inhibidores naturales más potentes de la fibrinólisis endógena. Pertenece a la gran familia de las serpinas, y actúa inhibiendo al activador del plasminógeno. Su secreción se ve incrementada en estados inflamatorios gracias a la acción de citoquinas como el TNF-alfa o la interleuquina-6, e interviene directamente en la génesis y ruptura de la placa de ateroma. Se ha evaluado su papel en el desarrollo de aterosclerosis sintomática y asintomática, y es bien conocida su estrecha relación con el síndrome metabólico y la resistencia insulínica<sup>160</sup>. En el campo de la aterosclerosis intracraneal sintomática, la progresión de las lesiones ateroscleróticas intracraneales se asoció también a un aumento de este biomarcador como ya hemos comentado anteriormente<sup>118</sup>.

#### **1.4.4. Prevención primaria: ausencia de recomendaciones específicas para su detección y tratamiento**

La aterosclerosis extracraneal ha sido ampliamente estudiada en sus fases asintomática y sintomática en las últimas dos décadas. Así, se han desarrollado múltiples estudios poblacionales, prospectivos y ensayos clínicos en relación a la aterosclerosis carotídea y vertebral. Es conocida su prevalencia en distintas poblaciones, los factores de riesgo asociados y su historia natural. Esto ha permitido realizar recomendaciones específicas en su evaluación y tratamiento en las guías internacionales de prevención primaria y secundaria<sup>161</sup>.

Al contrario, y como hemos revisado a lo largo de la introducción, la aterosclerosis intracraneal es todavía una patología pobremente estudiada. Su estudio se ha realizado de una manera errática entre

distintas poblaciones y con gran variabilidad en los métodos utilizados. Debido a la ausencia de estudios poblacionales y prospectivos centrados en la aterosclerosis intracraneal asintomática, no se conoce el verdadero impacto pronóstico de esta patología y por tanto no existen en la actualidad recomendaciones específicas en cuanto al despistaje y tratamiento preventivo de la aterosclerosis intracraneal asintomática.

Es importante desarrollar estudios poblacionales que nos permitan conocer por un lado, cuáles son los factores de riesgo (clínicos y moleculares) que se asocian a la presencia de la aterosclerosis intracraneal desde el estadio subclínico y por el otro, cuál es el impacto pronóstico de la misma.



**2**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En una población caucásica de sujetos mayores de 50 años expuestos a un riesgo vascular moderado-alto, sin historia de enfermedad cerebrovascular previa, se detectarán estenosis intracraneales ateroscleróticas con una prevalencia que oscilará entre el 5 y el 10%, y que será unas tres veces inferior a la frecuencia con la que se observaron estenosis intracraneales en población asiática de similares características. Los individuos que presenten aterosclerosis intracraneal asintomática en el estudio basal, en comparación con los que no la hayan desarrollado, se caracterizarán por estar expuestos a un mayor riesgo vascular y por cumplir en mayor medida criterios de síndrome metabólico.

Además, dado que existen importantes diferencias territoriales en el comportamiento de la aterosclerosis, determinados mecanismos básicos incidirían especialmente en el desarrollo de la aterosclerosis intracraneal, de forma que desempeñarían un papel más relevante en la aterogénesis intracraneal que en la extracraneal. A la inversa, existirían mecanismos básicos implicados con una mayor intensidad en el desarrollo de la aterosclerosis extracraneal que en el de la intracraneal. Postulamos que todos los mecanismos estudiados en este proyecto (disfunción endotelial, inflamación, resistencia a la insulina y fibrinólisis endógena) estarán más representados en aquellos pacientes que presenten lesiones ateroscleróticas extra o intracraneales, pero su contribución relativa variará en función del territorio afectado.

Por tanto, los principales objetivos de esta tesis son los siguientes:

- 1. Presentar el diseño y fundamentos de un estudio prospectivo de base poblacional centrado en el estudio de la aterosclerosis intracraneal asintomática.**
- 2. Determinar la prevalencia y gravedad inicial de la aterosclerosis intracraneal asintomática en una población caucásica con un riesgo vascular moderado-alto.**
- 3. Determinar los factores clínicos y metabólicos asociados a la presencia y gravedad inicial de la aterosclerosis intracraneal asintomática, y compararlos a los asociados a la presencia y gravedad de la aterosclerosis extracraneal asintomática.**
- 4. Determinar los marcadores biológicos circulantes asociados a la presencia y gravedad inicial de la aterosclerosis intracraneal asintomática, y compararlos a los asociados a la presencia y gravedad de la aterosclerosis extracraneal asintomática.**





**3**

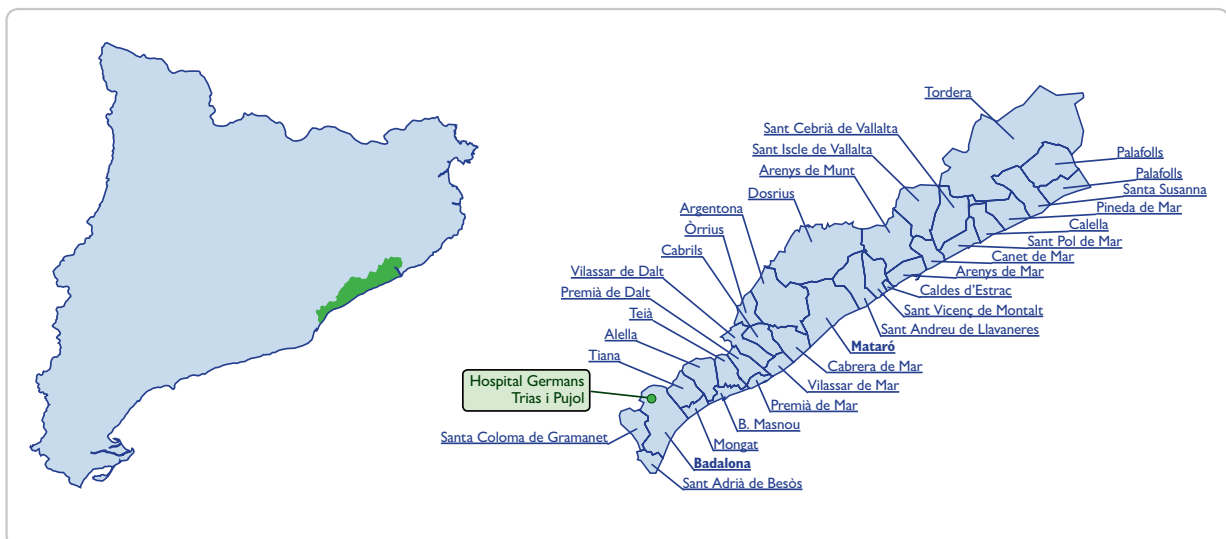
## **METODOLOGÍA**

El estudio Barcelona-AsIA (Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis) se diseñó con el fin de poder determinar la prevalencia e impacto pronóstico a largo plazo de la aterosclerosis intracraneal asintomática en población caucásica con un riesgo vascular intermedio o alto, así como identificar los factores clínicos, biológicos y genéticos asociados a su presencia, progresión y expresión clínica. Este proyecto ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III dentro de un programa FIS (PI 07/0393) y ha sido aprobado por el Comité de Ética de nuestra institución.

Los fundamentos y el diseño metodológico completo de las fases transversal y longitudinal del estudio constituyen el primer trabajo de investigación (*ARTÍCULO 1*) presentado en el apartado de resultados de esta tesis y que responde al objetivo I. Para no reiterar la información, resumiremos a continuación brevemente la metodología de la fase transversal del estudio, que es en la que se centran el resto de resultados.

### 3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO: ESTUDIO DE BASE POBLACIONAL

El área sanitaria de nuestro estudio está integrada por una población rural y urbana de unos 600.000 habitantes distribuidos en las regiones del Barcelonés Nord y Maresme (*Figura 11*). Los habitantes de esta área sanitaria reciben atención por parte de 28 centros de Atención Primaria y sus datos demográficos y clínicos están recogidos en una base de datos del Sistema de Información de Atención Primaria (SIAP). Entre Junio de 2006 y Marzo de 2007, en el marco de un proyecto que está en marcha sobre la prevalencia e impacto pronóstico de la arteriopatía periférica en nuestra población (estudio PERART) se seleccionó mediante un programa informático una muestra aleatoria simple de 3010 personas mayores de 50 años <sup>162</sup>. Los sujetos seleccionados fueron reclutados telefónicamente y visitados en sus centros de Atención Primaria correspondientes para ser incluidos en el citado estudio. Tras la firma del consentimiento informado se les realizó una evaluación exhaustiva de los factores de riesgo vascular y se calculó su riesgo cardiovascular utilizando la ecuación de REGICOR (adaptación de la función de Framingham para la población española, como se ha indicado detalladamente en la introducción de esta tesis). Asimismo, se realizó la medición del índice tobillo-brazo mediante ultrasonografía Doppler.



**Figura 11:** Mapa de la región sanitaria del Barcelonés Nord i Maresme.

De la muestra inicial aleatoria de 3010 individuos se seleccionaron los 1503 sujetos que cumplían con los siguientes **criterios de inclusión propios del estudio AsIA**:

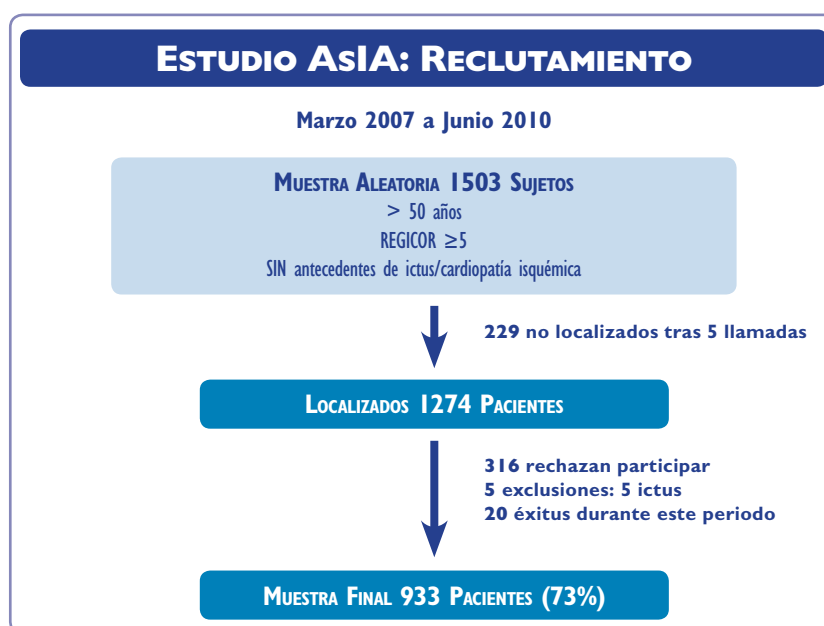
1. Ausencia de historia de ictus isquémico o hemorrágico.
2. Ausencia de historia de cardiopatía isquémica.
3. Exposición a un riesgo vascular intermedio o alto, definido por un punto de corte de las escala de riesgo REGICOR > 5% (ANEXO 2).
4. Ausencia de institucionalización o grave dependencia física o psíquica en el momento de iniciar el estudio.

A estos 1503 sujetos se les envió inicialmente una carta a su domicilio explicándoles el motivo de nuestro estudio y la posibilidad de ser llamados telefónicamente para invitarles a participar. Posteriormente, de forma consecutiva, los individuos fueron contactados telefónicamente desde la Secretaría de Neurociencias del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Se realizaron hasta 5 llamadas telefónicas en caso de no localizar al sujeto.

A los sujetos que aceptaron participar, se les programó una visita basal en nuestro centro donde se realizó la firma del consentimiento informado y donde se reevaluaron los criterios de exclusión del estudio.

Dada la prevalencia de aterosclerosis intracraneal asintomática reportada en población asiática del 24.5% (evaluando la afectación de cualquier arteria intracraneal <sup>136</sup>) y la proporción habitual de aterosclerosis intracraneal sintomática entre población asiática y caucásica de 3:1, se asumió en el diseño del estudio que aproximadamente un 8% (80 - 90) de los individuos estudiados presentarían estenosis intracraneales asintomáticas. Asumiendo un 10% de excluidos por no cumplir alguno de los criterios de selección, y un porcentaje de pérdidas del 20%, se esperaba estudiar finalmente a unos 1050 individuos. Aceptando un error alfa de 0.05, para un tamaño muestral de 1050 y una prevalencia esperada del 8%, se aseguró una potencia del 80% para detectar como estadísticamente significativa una odds ratio superior o igual a 2.0 en el estudio de factores asociados a la presencia de aterosclerosis intracraneal.

## 3.2. FASE DE RECLUTAMIENTO Y MUESTRA FINAL DEL ESTUDIO



**Figura 12:** Diagrama de flujo del reclutamiento de sujetos para el estudio.

La fase de reclutamiento del estudio tuvo lugar entre Marzo de 2007 y Junio de 2010. La muestra final del estudio comprende a 933 sujetos, todos de origen Caucásico a excepción de 8 sujetos procedentes de diferentes países de Latino-América. En la *Figura 12* se representa el diagrama de flujo durante la fase de reclutamiento. Las características clínicas (edad, sexo y riesgo vascular-REGICOR) de los pacientes que conforman la muestra final del estudio, de los pacientes no localizados, de los que rechazaron participar y de los que fallecieron durante el reclutamiento se presentan en la *Tabla 1*. Los pacientes no localizados son más jóvenes probablemente porque la mayoría de las llamadas se realizaron en horario laboral. La edad, el REGICOR y la proporción de varones en el grupo de los 20 pacientes fallecidos fue mayor, como es esperable.

	<b>Muestra final (n=933)</b>	<b>No localizados (n=229)</b>	<b>Rechazan (n=316)</b>	<b>Fallecidos (n=20)</b>
Varones (%)	63.7	60.7	64.6	85
Edad (±DE)	66.3 (±8.1)	64.7 (±8.7)	68.2 (±8.5)	74 (±10.8)
REGICOR	7 (5-10)	7 (6-8)	7 (6-10)	9.5 (6-15)

**Tabla 1**

### **3.3. VARIABLES CLÍNICAS BASALES**

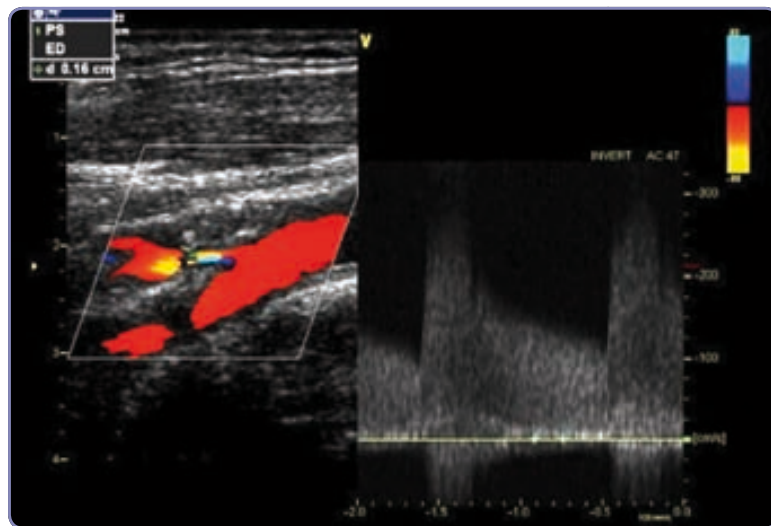
Se registraron las siguientes variables clínicas y antropométricas en la visita basal:

- 1.** Edad, sexo, nivel socioeconómico (ingreso medio mensual en la unidad familiar), grado de escolarización (analfabeto, estudios primarios, secundarios o superiores), actividad laboral (empleado, en paro, jubilado, ama de casa, discapacidad), nivel de actividad física (sedentario, actividad física intra-domicilio, actividad física extra-domicilio, Km caminados al día en la última semana).
- 2.** Registro de altura, peso, cintura abdominal, presión arterial en ambos brazos.
- 3.** Tratamiento médico en el momento de la visita.
- 4.** Existencia de factores de riesgo vascular en función de la historia del paciente y en base al tratamiento médico: tabaquismo, ingesta de alcohol, hipertensión, diabetes, dislipemia, obesidad.
- 5.** Duración de la diabetes, hipertensión y/o dislipemia.
- 6.** Antecedentes familiares de hipertensión, diabetes, dislipemia.
- 7.** Antecedentes personales de neoplasia, insuficiencia renal, enfermedad inflamatoria crónica, claudicación intermitente, intervenciones quirúrgicas de importancia, arritmia cardíaca, ansiedad, depresión.

### 3.4. DETECCIÓN DE ATEROSCLEROSIS INTRA Y EXTRACRANEAL

#### 3.4.1. Protocolo de ultrasonología

En la visita basal, se realizó un estudio neurosonológico eco-Doppler (dúplex) completo a todos los pacientes. Todos los estudios fueron realizados por dos neurólogos expertos en la técnica, en el mismo laboratorio y utilizando el mismo ecógrafo (General Electric Vivid 7 Pro). El protocolo de ultrasonografía está detallado en el *ARTÍCULO 1* de los resultados de la presente tesis. Describimos brevemente a continuación los puntos más relevantes.

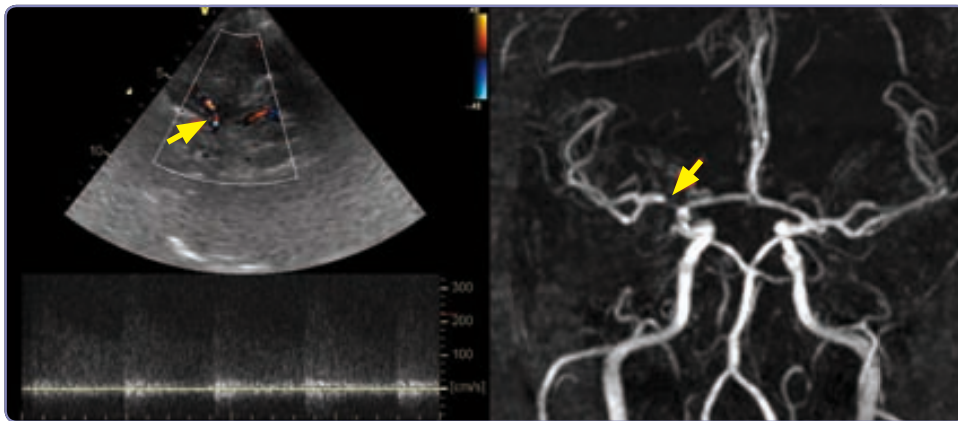


**Figura 13:** Estudio Dúplex carotídeo.

A la izquierda, imagen color donde se aprecia estrechamiento del haz de color en relación a la presencia de una placa isoecoica en el inicio de la carótida interna. A la derecha, análisis espectral que muestra velocidades en ese punto cercanas a 300 cm/s, correspondiendo a una estenosis grave.

Se realizó inicialmente una exploración de las grandes arterias del cuello (carótidas y vertebrales). En las arterias carótidas (comunes, internas y externas) se registró la presencia de placas de ateroma, sus características ecográficas y el grado de obstrucción de la luz. Para la carótida interna extracraneal se consideró una estenosis significativa o moderada-grave ( $\geq 50\%$ ) cuando la velocidad de flujo fue superior a 125 cm/s, según criterios validados (*Figura 13*). El estudio dúplex transcraneal (TCCD) se realizó por las ventanas transtemporal y suboccipital para la valoración de todas las grandes arterias de la circulación anterior y posterior respectivamente. En individuos con una ventana acústica insuficiente, se utilizó eco-contraste (Sonovue®). Tras la valoración del trayecto arterial con el modo color, se rea-

lizó un análisis espectral completo del flujo en cada segmento arterial, evaluando no sólo un aumento de velocidad focal sino la presencia de señales de alta intensidad y baja frecuencia correspondientes a un flujo turbulento (Figura 14, panel A). Se registraron la localización de las estenosis y su número. La gravedad de las lesiones (menor al 50% o leves y mayor al 50% o moderadas-graves) se estableció en base a los criterios publicados por Baumgartner et al<sup>55</sup>.



**Figura 14:** Ejemplo de estenosis de ACM.

**Panel A:** Imagen de Dúplex transcraneal en el que se aprecian en color las arterias cerebral media y posterior derechas. En el segmento proximal de la ACM derecha, estrechamiento del haz de color (**flecha**). Abajo, espectro arterial correspondiente a ese punto que muestra velocidades sistólicas cercanas a 350 cm/s así como señales de alta intensidad y baja frecuencia correspondientes a flujo turbulento en el seno de una estenosis grave.

**Panel B:** imagen de ARM del mismo paciente que muestra la estenosis de la ACM derecha (**flecha**)

### 3.4.2. Protocolo de Resonancia Magnética

Los sujetos en los que se detectó al menos una estenosis intracraneal en el dúplex transcraneal inicial, fueron invitados a someterse a un estudio con resonancia magnética y secuencia angiográfica (ARM) en el plazo de 6 meses desde la visita inicial. Los pacientes con contraindicaciones para la realización de este estudio (prótesis metálicas, marcapasos, claustrofobia) fueron excluidos de esta segunda prueba diagnóstica.

Todas las exploraciones de RM craneal se realizaron con un aparato 1.5-T (Intera, Philips) dotado de una capacidad ecoplanar de 25mTeslas/m y rise-times de 300 a 350 microsegundos. La ARM emplea una secuencia tridimensional, time-of-flight, con secciones de 1.5mm de grosor, 200mm field of view, 200 x 512 matrix, y tiempo de adquisición entre 7 y 11 minutos. Se realizaron reconstrucciones Maximal Intensity Projection (MIP). Se confirmó la presencia de una estenosis intracraneal ante una reducción focal del calibre arterial superior al 50% de la luz (Figura 14, panel B).



### 3.5. ESTUDIO NEUROPSICOLÓGICO BASAL

En la visita basal todos los pacientes fueron también invitados a participar en el proyecto Barcelona-AsIA-Neuropsicología. Este subestudio se diseñó para evaluar el rendimiento cognitivo en nuestra población de estudio y su relación con los factores de riesgo vascular y la presencia de aterosclerosis cerebral subclínica. Los sujetos que aceptaron participar, tras la firma de un consentimiento informado específico, fueron estudiados durante aproximadamente una hora con una amplia batería neuropsicológica incluyendo pruebas que evalúan diferentes habilidades cognitivas: inteligencia premórbida, grado cognitivo general, sintomatología depresiva, funciones ejecutivas, atención, memoria visual y verbal, habilidades visuo-espaciales y visuo-constructivas, coordinación y lenguaje. Los neuropsicólogos evaluadores desconocían las características clínicas de los sujetos así como los resultados del estudio ultrasonológico.

### 3.6. BIOBANCO: DETERMINACIÓN DE PERFIL BIOQUÍMICO, ÍNDICE HOMA Y BIOMARCADORES CIRCULANTES

Todos los sujetos acudieron a la visita basal tras un ayuno de 12 horas. Tras la recogida de variables clínicas y antropométricas, y previa a la realización del estudio ultrasonológico, se realizó una extracción sanguínea de una vena antecubital. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se realizó el pipeteado del suero, plasma y sangre total en alícuotas. En cada paciente se procesaron 12 criotubos de suero, 2 de plasma citrato, 2 de plasma-EDTA y 2 de sangre total. Todas las muestras se etiquetaron apropiadamente y se almacenaron en un congelador a -80° C hasta su posterior análisis.

Para el trabajo de investigación presentado en el *ARTÍCULO 2*, se realizó la determinación en suero de los siguientes parámetros bioquímicos: colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, glicemia e insulinemia.

Para el tercer trabajo de investigación, presentado en el *ANEXO 1*, se realizó la determinación de los biomarcadores ADMA, PCR, resistina y PAI-I, cuyas propiedades se han descrito en la introducción (*apartado 1.4.3*). La concentración de PCR de alta sensibilidad se obtuvo por nefelometría, y los restantes marcadores (ADMA, resistina, PAI-I) se determinaron por duplicado mediante ELISA comerciales. La resistencia a la insulina se estimó mediante el índice de HOMA, usando la fórmula descrita por *Matthews*: [glicemia (mg/dl) X insulinemia (mUI/ml)/ 405].

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se creó una base de datos prospectiva con los datos clínicos, ultrasonográficos, radiológicos y de laboratorio de todos los pacientes. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS (versión 15.0, Chicago IL). La significación estadística para diferencias entre grupos se estimó con los test  $\chi^2$  para variables categóricas y t-Student, Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para variables continuas.

En el segundo trabajo de investigación (*ARTÍCULO 2*) se realizaron dos análisis de regresión logística para estudiar los factores asociados a la presencia de aterosclerosis intracraneal y a su gravedad basal. Por un lado, se dividió a la muestra de sujetos en dos grupos, los que presentaban estenosis intracraneales en la visita neurosonológica basal y los que no presentaban dichas estenosis intracraneales, realizándose posteriormente un análisis de regresión logística binaria. Por otro lado, se dividió a la muestra en tres grupos según la gravedad de las lesiones intracraneales: los que no presentaban estenosis intracraneales, los que presentaban una o más estenosis leves (aterosclerosis intracraneal leve) y los que presentaban al menos una estenosis intracraneal de grado moderado-grave (aterosclerosis intracraneal moderada-grave). Se realizó entonces un análisis de regresión logística multinomial, tomando como referencia al grupo de los que no tenían estenosis intracraneales.

En el tercer trabajo de investigación (*ANEXO 1*), se realizaron dos análisis de regresión logística multinomial para estudiar los factores clínicos y analíticos relacionados con la localización extracraneal-intracraneal de la aterosclerosis y su gravedad. Por un lado, se dividió a la muestra de sujetos en cuatro grupos: un grupo control sin aterosclerosis extra ni intracraneal, un grupo con aterosclerosis extracraneal aislada (sin aterosclerosis intracraneal), un grupo con aterosclerosis intracraneal aislada, y un grupo con aterosclerosis combinada (intra y extracraneal simultáneamente). Por el otro lado, se dividió la muestra en tres grupos: un grupo control (el mismo que el previo), un grupo con aterosclerosis extracraneal de grado moderado-grave y un grupo con aterosclerosis intracraneal de grado moderado-grave. Los análisis de regresión logística multinomial se realizaron tomando como referencia el grupo control (sin aterosclerosis extra ni intracraneal).

La significación estadística se estableció en  $p < 0.05$  y los resultados se reportaron como odds ratio e intervalos de confianza al 95%.



**4**

## **RESULTADOS**

#### **4.1. ARTÍCULO I:**

The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis study (AsIA): rationale and design.

*BMC Neurology 2011, Feb 17; 11:22*

## STUDY PROTOCOL

## Open Access

# The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis Study (ASIA): rationale and design

Elena López-Cancio<sup>1\*</sup>, Laura Dorado<sup>1</sup>, Mónica Millán<sup>1</sup>, Silvia Reverté<sup>1</sup>, Anna Suñol<sup>1</sup>, Anna Massuet<sup>2</sup>, María Mataró<sup>3</sup>, Amparo Galán<sup>4</sup>, Maite Alzamora<sup>5</sup>, Guillem Pera<sup>5</sup>, Pere Torán<sup>5</sup>, Antoni Dávalos<sup>1</sup>, Juan F Arenillas<sup>6</sup>

## Abstract

**Background:** Large-artery intracranial atherosclerosis may be the most frequent cause of ischemic stroke worldwide. Traditional approaches have attempted to target the disease when it is already symptomatic. However, early detection of intracranial atherosclerosis may allow therapeutic intervention while the disease is still asymptomatic. The prevalence and natural history of asymptomatic intracranial atherosclerosis in Caucasians remain unclear. The aims of the Barcelona-ASymptomatic Intracranial Atherosclerosis (ASIA) study are (1) to determine the prevalence of ASIA in a moderate-high vascular risk population, (2) to study its prognostic impact on the risk of suffering future major ischemic events, and (3) to identify predictors of the development, progression and clinical expression of this condition.

**Methods/Design:** Cross-over and cohort, population-based study. A randomly selected representative sample of 1,503 subjects with a mild-moderate-high vascular risk (as defined by a REGICOR score  $\geq 5\%$ ) and with neither a history of cerebrovascular nor ischemic heart disease will be studied. At baseline, all individuals will undergo extracranial and transcranial Color-Coded Duplex (TCCD) ultrasound examinations to detect presence and severity of extra and intracranial atherosclerosis. Intracranial stenoses will be assessed by magnetic resonance angiography (MRA). Clinical and demographic variables will be recorded and blood samples will be drawn to investigate clinical, biological and genetic factors associated with the presence of ASIA. A long-term clinical and sonographic follow-up will be conducted thereafter to identify predictors of disease progression and of incident vascular events.

**Discussion:** The Barcelona-ASIA is a population-based study aiming to evaluate the prevalence and clinical importance of asymptomatic intracranial large-artery atherosclerosis in Caucasians. The ASIA project may provide a unique scientific resource to better understand the dynamics of intracranial atherosclerosis from its early stages and to identify new potential therapeutic targets for this condition.

## Background

Atherosclerosis is a systemic disease with multifactorial etiology now considered the primary cause of morbidity and mortality in developing countries.

Large artery intracranial atherosclerosis disease (ICAD) is a major public health problem as it is probably the major cause of stroke worldwide and consequently, a main cause of long-term disability and mortality [1]. Accumulating evidence suggests that

ICAD can also contribute to the development of cognitive impairment and Alzheimer disease although more studies are needed to establish this association [2-5]. Even so, it is a relative neglected frontier [1]. Despite the extended use of non invasive diagnostic techniques as transcranial Doppler (TCD), transcranial color-coded-duplex (TCCD), magnetic resonance angiography (MRA) or computed tomography angiography ICAD is an infradiagnosed and understudied disease when compared to extracranial atherosclerosis.

When it turns to symptomatic, intracranial atherosclerosis is a dynamic and aggressive disease. The rate of stroke recurrence is high (up to 18% in >70% stenosis) despite

\* Correspondence: [elenacancio@gmail.com](mailto:elenacancio@gmail.com)

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

medical treatment [6-10], and the best therapy for symptomatic intracranial atherosclerosis still remains unknown [11]. In this context, there is a need to increase our knowledge about basic mechanisms and dynamics of intracranial atherosclerosis progression from its preclinical stage.

Intracranial atherosclerosis is not an isolated disease, but related to generalized atherosclerosis affecting other territories as carotid, coronary or peripheral artery disease [12,13]. One essential aim in primary prevention is to find tools to improve the evaluation of "the vulnerable patient" [14,15]. Classic vascular risk functions (as Framingham) are now being combined with new markers as carotid intima-media thickness, ankle-arm index or CRP values [16] to assess individual vascular risk. Therefore, the identification of new blood, genetic or instrumental biomarkers for asymptomatic atherosclerosis may be crucial to predict and prevent future ischemic events.

Traditional approaches have attempted to target ICAD when it is already symptomatic so there is a lack of studies in the asymptomatic stage. Population studies aimed to determine its prevalence and related vascular risk factors have only been developed in Asian populations, using transcranial Doppler to assess the presence of stenosis [17-20]. Therefore, the prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis remains unknown in Caucasians.

In this context of uncertainty regarding the prevalence and clinical importance of asymptomatic intracranial atherosclerosis in Caucasians, we designed a prospective study called Barcelona-ASIA (ASymptomatic Intracranial Atherosclerosis), aimed (1) to determine the prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis in a randomly selected Caucasian population with moderate-high vascular risk; (2) to study its prognostic impact on the risk of suffering future major ischemic events and/or cognitive decline; and (3) to identify predictors of the development, progression and clinical expression of this condition.

This article describes the protocol details of the Barcelona-ASIA study.

### Methods/Design

This is a population-based, prospective, long-term follow-up observational study that will include over a thousand randomly selected healthy subjects exposed to vascular risk factors and without history of stroke or ischemic heart disease. The study will have two phases, cross-sectional and longitudinal. In the first cross-sectional phase, all study subjects will undergo an extensive clinical, laboratory, ultrasound, neuropsychological and neuroimaging protocol in order to determine the prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerotic stenoses among the study population and to identify clinical, biological and genetic associated factors. In the second phase, a long-term clinical and TCCD follow-up will be

performed with the purpose of determining the impact of asymptomatic intracranial atherosclerosis on the incidence of major vascular events and cognitive impairment.

### Subject selection

This study will be carried out in the Germans Trias i Pujol University Hospital, a public health tertiary centre of the Barcelonès Nord and Maresme region (Catalonia, Spain), and it is coordinated with the regional Primary Health Care network. The protocol has been approved by the Ethics Committee of our institution.

A rural and urban population of approximately 600.000 residents integrates our metropolitan area. This entire population is registered in a database of the Primary Care Information Technology System (SIAP). A sample of 3010 subjects older than 50 years was randomly selected in 2007 within the PERART study, an ongoing trial that aims to estimate the prevalence and prognosis impact of the peripheral artery disease in our population. Selection of the PERART cohort is described in detail elsewhere [21]. Framingham and REGICOR (Framingham calibrated for Spanish population [22]) functions were previously calculated in all these participants at the initial visit of PERART study.

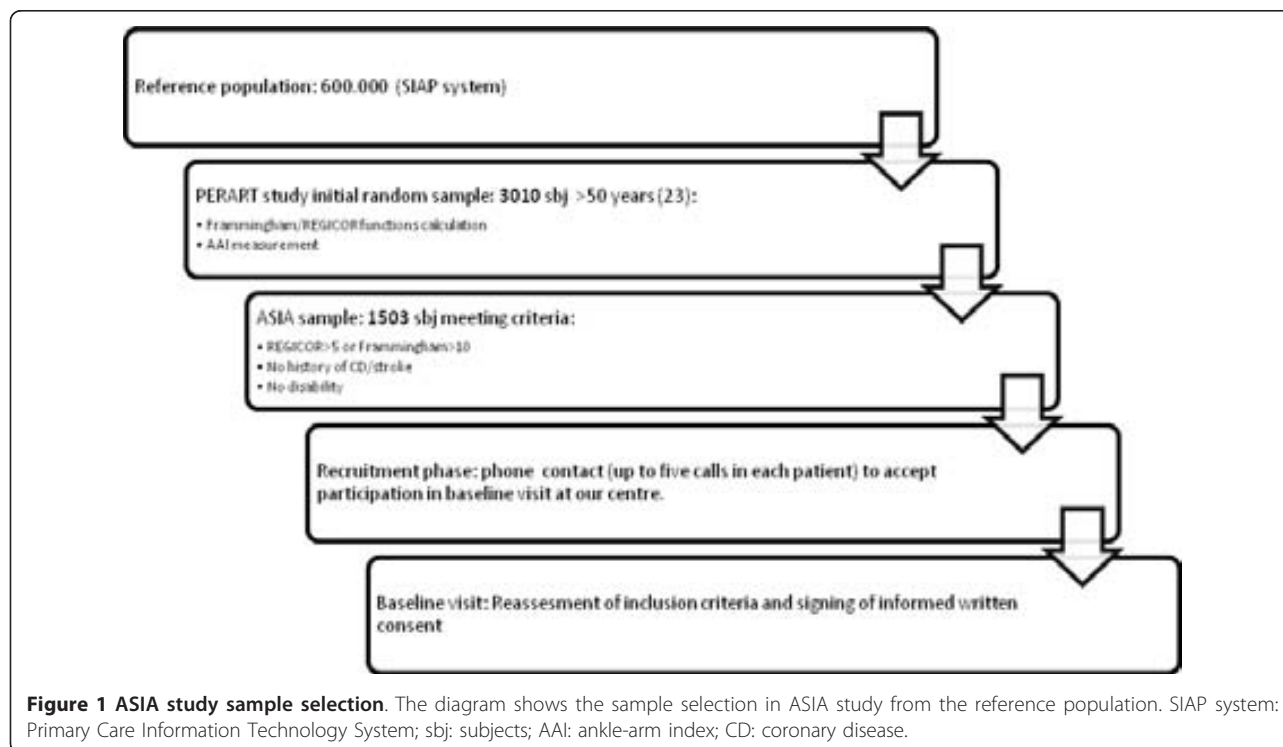
The ASIA cohort derives from this PERART cohort. From the initial PERART sample of 3010 subjects, we will evaluate the 1503 subjects who met the following inclusion criteria: (1) No history of stroke or transient ischemic attack; (2) No history of coronary disease; (3) Exposure to a light-moderate-high vascular risk, assessed by a REGICOR $\geq$ 5 (which is equivalent to a Framingham > 10); (4) Absence of institutionalization, severe disability or previous chronic neurological/psychiatric disease.

First, on February 2007 a letter was sent to all 1503 selected participants warning them about the study and the chance of being called to take part in it. They were given a 15-day period to express their refusal to collaborate in the study, but no patient denied participation at that time. Subsequently, all possible participants will be contacted by phone (up to five calls) during the recruitment phase. A subset of this initial sample may reject to take part in the study when being informed about the conditions of the study during this phone call. Finally, among the subjects who will accept to come to our hospital for the baseline visit, some will be excluded after reassessment of inclusion criteria (Figure 1). We estimate that about 1000 subjects may complete the study, assuming a 10% of exclusions and a 20% of not-accepting participants.

### Baseline procedures at initial visit in our centre (Figure 2)

#### 1. Signing of informed written consent

**2. Clinical data collection.** Clinical data of every subject will be collected in a questionnaire specifically designed for this study:



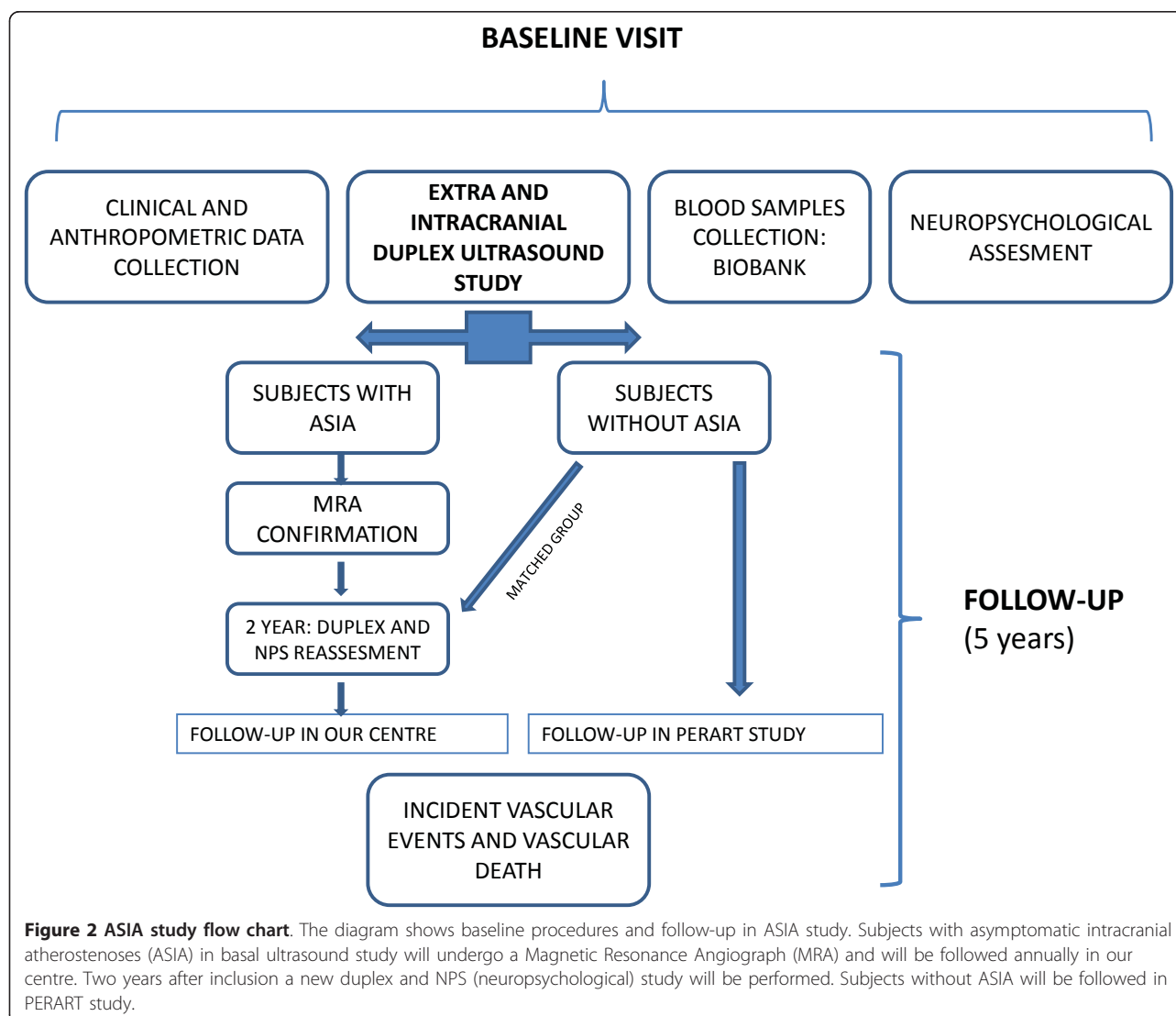
- Sociodemographic variables: age, sex, socioeconomic status (monthly income in the family unit), education status (years of schooling, grade), employment (active, unemployed, retired, disqualified, housewife).
- Vascular risk factors: smoking habit (never, current, former), alcohol intake (g/day), physical activity level (sedentary, home-activity, outdoor activity and grade, walked Km/day in the last week), personal and family history of hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia.
- Current drug intake (platelet inhibitors, anticoagulants, lipid-lowering drugs, antihypertensives, hypoglycemic agents, antidepressants, etc).
- Vascular events presented between inclusion in the PERART study and baseline visit at our centre will be recorded: angina, myocardial infarction, intermittent claudication. Incidental stroke before the ASIA baseline visit was an exclusion criteria.
- Anthropometric variables: height, weight, waist circumference, current systolic/diastolic blood pressure values in both arms
- Ankle-arm index (AAI) was measured in all participants in PERART study as previously described (25).
- Others: Personal history of anxiety or depression, pharmacologic treatments in the moment of inclusion.

**3. Biological and genetic studies.** Twelve serum, 2 citrated plasma, 2 plasma-EDTA and 2 total blood cryotubes will be collected, processed and stored in each subject at baseline visit after a minimum of 12 fasting hours. After centrifugation at 3500 rpm and 4°C for 15 minutes, serum or plasma will be blind coded and stored at -80°C until analyzed.

**4. Ultrasound protocol.** All the Duplex studies will be performed in the same ultrasound lab (Neuroscience Department of Germans Trias i Pujol Hospital) using a General Electric Vivid/Pro (GE Vingamed Ultrasound, Horten, Norway), by two experienced neurologists. First, a cervical study will be performed to detect presence and severity of atherosclerotic plaques in carotid arteries and origin of vertebral arteries, and to measure the intima-media thickness (IMT). Later, a transcranial duplex will be set to examine bilateral intracranial carotid artery (ICA), middle cerebral artery (MCA), anterior cerebral artery (ACA), posterior cerebral artery (PCA), vertebral artery (VA) and basilar artery (BA). All studies will be performed with subject in supine position.

**a. Extracranial study:** It will be performed using a linear transducer 5-15 Hz (predefined parameters: 8.5 MHz, 4 cm focus, FPS 63.8).

◦ **Carotid assessment:** First, a high resolution B-mode study will be conducted in longitudinal



and cross-sectional planes over the whole visible length of the following arterial segments: proximal and distal common carotid artery, carotid bifurcation and internal carotid artery. The most pathologic areas in every arterial segment will be analyzed and images stored.

- Atherosclerotic plaques. According to Mannheim consensus criteria, atherosclerotic plaques are defined as follows: focal structure encroaching into the arterial lumen of at least 0.5 mm or 50% of the surrounding IMT value, or demonstrating a thickness > 1.5 mm as measured from the media-adventitia interface to the intima-lumen interface [23]. Atherosclerotic plaques will be further characterized by the following criteria:

- Plaque surface: regular smooth, irregular, ulcerated [24]

- Echogenicity: anechogenic, hypo-anechogenic, hypo-isoechogenic, iso-hyperechogenic.

- IMT. According to Mannheim consensus criteria, IMT is defined as a double-line pattern (the interface between lumen-intima and interface between media-adventitia) visualized by B-mode sonography on both walls of the carotid arteries in a longitudinal image. IMT will be measured in regions without atherosclerotic plaque, preferably in CCA, in the far wall and more than 10 mm away from carotid bifurcation. Two values will be obtained: manual measurement of maximum IMT and automated measurement of mean IMT.

Next, Doppler spectrum analyses will be performed to assess the grade of stenosis depending on the systolic peak velocity [25]: <50%: <125 cm/s; 50-70%: 125-230 cm/s; >70%: > 230 cm/s.



Significant carotid atherosclerosis will be considered when the stenosis is  $\geq 50\%$ . In stenosis  $< 50\%$  the percentage of luminal obstruction in axial plane will be calculated.

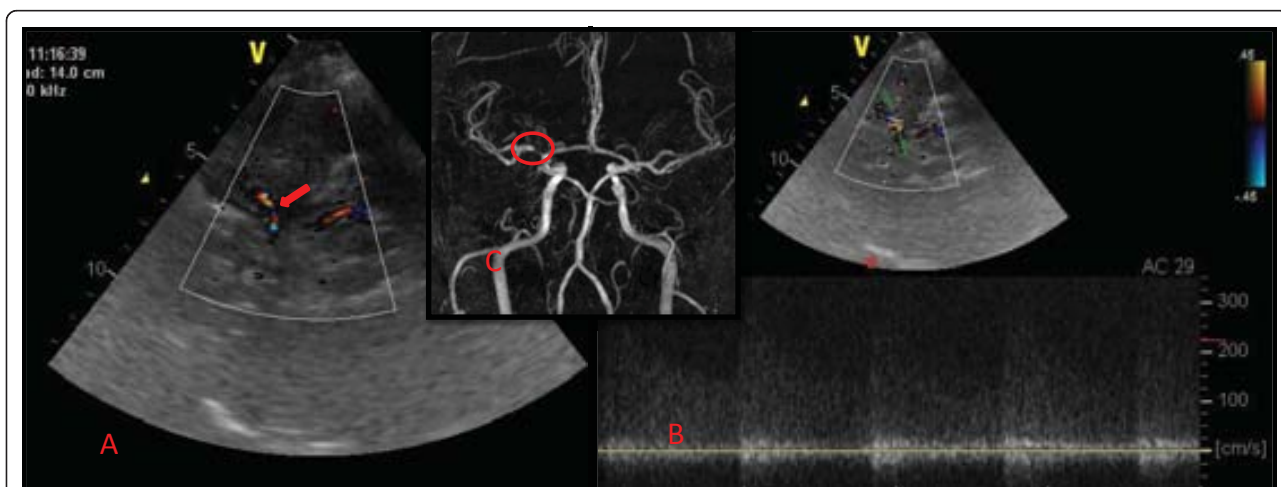
◦ **Vertebral arteries:** Extracranial vertebral arteries will be studied in the following segments: V2 segment (longitudinal insonation plane, framed by acoustical shadow of transverse processes); V0/V1 segment (origin from subclavian artery); and V3 segment (transverse insonation below mastoid bone, comma-shaped). We will characterize vertebral arteries following spectrum analyses [26] as normal, stenosis  $>50\%$  (SP  $>125$  cm/s) or occlusion (absence of telediastolic flow).

**b. Transcranial color-coded-duplex (TCCD) study:** It will be performed using a 1.6-3.2 MHz transducer via transtemporal and transforaminal windows (patient in supine position) to evaluate circle of Willis and its branches, following consensus recommendations for an optimal exploration [27]. Each large cerebral artery will be investigated by spectral Doppler sonography with the color-coded Doppler signal used as a "road map". Flow direction, peak systolic (PSV), mean flow (MFV) and end-diastolic (PDV) velocities, pulsatility index (PI) and resistance index (RI) will be noted for every insonated artery. Angle correction will be performed when the Doppler sample volume is located within a straight vessel segment of at least 15-20 mm. By transtemporal bone window, we will study intracranial carotid artery (ICA) in axial and coronal planes, middle cerebral artery (M1 and M2 segments), anterior

cerebral artery (A1 segment) and posterior cerebral artery (P1 and P2 segments). By transforaminal bone window we will study vertebral artery (V4 segment) and basilar artery (BA). If there is an insufficient acoustic window in transcranial examination, an enhance contrast agent will be used intravenously (Sonovue<sup>®</sup>)

#### Intracranial stenosis definition and grading

An intracranial stenosis will be diagnosed following previous published criteria. First, using color-coded mode as a road map we will assess flow direction and presence of segmental color aliasing phenomena in all arteries. Then, we will determine the presence of an intracranial stenosis if the spectral analysis shows a focal increase of PSV and/or PDV higher than the mean value  $+ 2$  SD for the corresponding cerebral artery or low-frequency, high-intensity Doppler signals, spectral widening or musical murmurs [28]. An example of intracranial stenosis is illustrated in figure 3. ICA stenosis will be diagnosed following published reference velocity values and recommendations, assessing not only differences in velocities between the two sides but also looking for activation of collaterals (anterior and/or posterior communicating arteries) and/or flow repercussion in extracranial internal carotid [29-31]. Following systolic peak criteria MCA stenosis will be graded into low-grade (140-209 cm/s), moderate (210-279 cm/s) and high-grade ( $>280$  cm/s) [32]. For the rest of intracranial arteries we will follow cut-off values of PSV for  $< 50\%$  and  $\geq 50\%$  stenosis [33]:  $\geq 120/\geq 155$  cm/s for anterior cerebral artery;  $\geq 100/\geq 145$  cm/s for posterior cerebral



**Figure 3** Example of right middle cerebral artery (MCA) stenosis. In left image (A) TCCD color mode shows an area of narrowing and color aliasing in the proximal segment of right MCA (arrow). In the right image (B), an spectral flow analyses is set to determine systolic peak velocity and appearance of low-frequency, high-intensity Doppler signals. In the middle superimposed image (C), a magnetic resonance angiogram (MRA) made in the same subject shows a flow gap in right MCA (circle) corresponding to a high-grade stenosis.

and basilar arteries and  $\geq 90/\geq 120$  cm/s for vertebral artery. Furthermore, when a focal increase of velocity is detected, the proximal and distal vessel segments will be evaluated (pre-stenotic and post-stenotic flow patterns in the upstream and downstream vessel segments) and potential collateral pathways will be considered in order to assess hemodynamic repercussion. Number, location and severity of intracranial stenosis will be recorded in every subject.

#### Neuropsychological assessment

Neuropsychological studies will be performed at baseline visit in our centre after accepting and signing specific informed written consent. Neuropsychological studies will be performed by neuropsychologists blinded to neurosonology study results. General cognitive status will be measured using the Mini Mental State Examination. Depressive symptoms will be assessed with the Geriatric Depression Scale with scores higher than 5 being indicative of probable depression. Cognitive measures will assess executive functions, attention, verbal and visual memory, visuoconstructive abilities, speed/visuomotor coordination and language.

#### Magnetic Resonance (MR) and MR-angiography (MRA) study

A complete MR will be conducted to patients with stenosis detected by TCCD if they have no contraindication. All explorations will be performed with the same 1.5T MR (Intera, Philips), with an echo-planar capacity of 25 m Teslas/m and time-rises of 300-350 microseconds. The MRA will be performed by a time-of-flight (TOF) sequence, using 1.5 mm section slides, 200-mm field of view,  $200 \times 512$  matrix, and 7-11 minutes of acquisition. Maximal intensity projection (MIP) reconstructions will be set.

All MR studies will be performed in a 6 months maximum period from baseline inclusion visit (sonographic study). MRAs will be analyzed by a neuroradiologist blind to clinical and sonographic data. Intracranial stenosis will be defined as flow irregularity and focal narrowing  $>50\%$  in luminal reduction affecting the main cerebral arteries.

#### Primary prevention strategies

- **Vascular risk factors control (obesity, hypertension, dyslipidemia, hyperglycemia, sedentarism, smoking habit...)**. The family doctor will assume their control, after receiving a brief report of the neurosonological study and the clinical data obtained in the baseline visit in our centre.
- **Antiplatelet treatment**: After neurosonological study, antithrombotic treatment (300 mg of aspirin or 75 mg of clopidogrel-if there is intolerance/allergy to aspirin-) will be recommended according to

AHA/ASA primary prevention guidelines [34] in the following cases: asymptomatic carotid stenosis  $>50\%$ ; significant stenosis of extracranial vertebral arteries and/or asymptomatic intracranial stenosis.

- **Carotid revascularization**: Following the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS) [35], carotid revascularization (endarterectomy or endovascular) will be recommended in carotid stenosis  $>60\%$ , performed by surgeons or interventional neuroradiologists with periprocedural complication rates lower than 3%.

#### ASIA clinical and image database

Clinical data will be recorded in CRFs. Blood samples will be processed, frozen and stored in our biobank. Images obtained in neurosonological studies will be stored in a specific workstation (Echo Pack) to be analyzed afterwards. A prospective electronic database will be created with clinical, neurosonological and laboratory variables of the cross-over and longitudinal phases of the study.

#### Prospective follow-up (cohort study)

Participants will be followed-up annually for 5 years by primary care physicians of the PERART study to document the incidence of vascular events, therapeutic compliance and control of vascular risk factors. The primary endpoint will be the combined incidence of any major vascular event: acute myocardial infarction or angina requiring hospitalization, ischemic stroke, hemorrhagic stroke and vascular death.

Subjects with intracranial stenosis at baseline will be controlled in the Germans Trias i Pujol University Hospital annually. A new neurosonological and neuropsychological study will be performed two years after inclusion to study progression or regression of the intracranial lesions and cognitive decline. In addition, a matched group of subjects without baseline ASIA will be studied. Vascular events will be adjudicated by an external monitoring committee comprising of two neurologists and one cardiologist.

#### Statistical considerations

Statistics will be performed with the SPSS 18.0 statistical package. Quantitative variables will be compared with the Student's t test and analysis of variance will be performed, using the corresponding non parametric tests when necessary. Chi squared test will be used for comparisons of categorical variables. In the cross-over phase, multiple logistic regression models will be performed to identify variables independently associated with the presence of asymptomatic intracranial atherosclerotic lesions. In longitudinal phase, survival analysis for the

combination of major vascular events and for each vascular event will be performed with the Kaplan-Meier curves according to the presence/absence of intracranial stenosis. Cox multivariate regression models will be used to compare the probability of having a vascular event in the follow up cohorts, adjusting for the necessary covariates. The relative risk (hazards ratios) will be given with their corresponding 95% confidence intervals.

### Discussion

Despite of its relevant impact on public health and the development of new non-invasive diagnostic tests, intracranial atherosclerosis is still an understudied pathology. ICAD is the origin of 5-10% of strokes in Caucasians [36,37] and up to 50% in Asians [38,39]. Limited data about preclinical stage and natural history of ICAD are available in the general population. The only population studies to determine its prevalence in stroke-free individuals were developed in Asians without prospective follow-up to assess the risk of vascular events (21-25). These studies have some limitations as they evaluated intracranial stenosis only with transcranial Doppler, they did not use contrast agents and some of them only evaluated middle cerebral artery. There is too much variability in their methods to compare them and to establish a real prevalence. Our study is the first to evaluate the prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis in Caucasians. As it is a cohort study we will also investigate the ASIA prognosis impact, not only in the appearance of cerebral events but also in coronary and peripheral artery disease, and in the development of vascular cognitive impairment.

We will determine clinical, instrumental (IMT and AAI measurements) and biological risk factors related to asymptomatic ICAD in order to identify factors associated with its progression and clinical expression. We will be able to analyze whether factors that have been already related to disease progression in its symptomatic stage, such as inflammatory markers, also play a role in asymptomatic intracranial atherosclerosis [40-43]. Furthermore, we would evaluate the importance of using those risk factors as risk markers in terms of general vascular primary prevention.

The reasons that explain the racial and interindividual differences observed in the distribution of cerebral atherosclerosis affecting extra and intracranial arteries remain poorly understood. Differences in vascular risk factors profile, inflammatory markers, life-style and genetic susceptibility are proposed as possible answers but studies are contradictory. Our study could contribute to clarify this matter since we will evaluate extracranial and intracranial vasculature in each patient.

Finally, many studies are stressing the possible relationship between ICAD and cognitive impairment.

A simultaneous protocol in collaboration with our neuropsychological team has been created to evaluate cognitive status in every subject of ASIA study. Consequently, the ASIA results may help to find out biological, sonographic and clinical factors related to the presence of vascular cognitive impairment in asymptomatic individuals.

Strengths of this study are: 1). Randomized, large sample population study that will provide a generalized estimation of prevalence of asymptomatic intracranial stenosis in Caucasians, which nowadays remains unknown; 2). TCCD assessment of all intracranial arteries (anterior and posterior circulation) in all subjects, use of contrast agents if insufficient acoustic window and MRA assessment in subjects with stenosis; 3). Complete cerebral neurosonology study in each patient (intracranial and extracranial) because an adequate interpretation of intracranial findings always requires a careful assessment of the influence of extracranial pathology on the intracranial hemodynamics; 4). A bio-bank will be created allowing investigation of molecular and genetic factors related to the presence and progression of intracranial atherosclerosis; 5). Long-term follow-up that will allow us to establish prognosis and related factors of incidental stroke and major vascular events, and to evaluate progression/regression of intracranial lesions.

We hope ASIA study will contribute to the better understanding of intracranial atherosclerotic disease dynamics and help us to identify new potential therapeutic and prevention targets for this condition.

### Funding support

This project is supported by the program of Promotion in the Biomedical Investigation and Health Sciences from the Carlos III Health Institute of the Spanish Health and Social Policy Ministry [PI070393]. Dr. López-Cancio is a neurologist granted with a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute of the Spanish Health and Social Policy Ministry, co-financed by the Germans Trias i Pujol Research Institute Foundation. Neuropsychological studies are supported by the Juan de la Cierva research program of the Spanish Health and Social Policy Ministry [SEJ2006-15399/PSIC].

### Acknowledgements

We gratefully thank investigators of PERART study as they provided us the randomized sample of subjects meeting criteria for our study, the data needed to calculate vascular risk functions and the AAI measurements. We also thank administratives of our Neurology department for undertaking the telephone calls and programming the clinic visits.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Magnetic Resonance Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat

Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Psychiatry and Clinical Psychobiology, Universitat de Barcelona, Barcelona (Spain). <sup>4</sup>Department of Biochemistry, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Primary Healthcare Research Support Unit Metropolitana Nord, ICS-IDIAP Jordi Gol, Mataró, Barcelona, Spain. <sup>6</sup>Neurology Service, Stroke Unit, Hospital Clínic Universitario, Valladolid, Spain.

#### Authors' contributions

JFA conceived of and designed the study and is the principal investigator; AD is the Neurosciences Department of Germans Trias I Pujol Hospital director, participated in study design, have made a major revision of this manuscript and will provide all logistic support; ELC will carry out subject basal visits, ultrasonographic studies, database maintenance, subjects follow-up, coordination with other departments and wrote the initial draft of this article; LD will carry out patient basal visits and ultrasonographic studies; AS and SR will carry out the anthropometric and blood pressure measurements in basal visit and the processing and storage of biobank; AG will carry out molecular and biochemistry studies. MM will coordinate all neuropsychological studies; MA, PT and GP provided randomized sample of subjects and clinical data from PERART study and will coordinate the follow-up study in primary care network. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 8 November 2010 Accepted: 17 February 2011

Published: 17 February 2011

#### References

- Gorelick PB, Wong KS, Bae HJ, Pandey DK: **Large artery intracranial occlusive disease: A large worldwide burden but a relatively neglected frontier.** *Stroke* 2008, **39**(8):2396-9.
- Roher AE, Garami Z, Alexandrov AV, Kokjohn TA, Esh CL, Kalback WM, Vedders LJ, Wilson JR, Sabbagh MN, Beach TG: **Interaction of cardiovascular disease and neurodegeneration: Transcranial doppler ultrasonography and alzheimer's disease.** *Neural Res* 2006, **28**(6):672-8.
- Beach TG, Wilson JR, Sue LI, Newell A, Poston M, Cisneros R, Pandya Y, Esh C, Connor DJ, Sabbagh M, Walker DG, Roher AE: **Circle of willis atherosclerosis: Association with alzheimer's disease, neuritic plaques and neurofibrillary tangles.** *Acta Neuropathol* 2007, **113**(1):13-21.
- Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P, World Federation of Neurology Dementia Research Group: **Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: Prevalence, management, and risk factors.** *Lancet Neurol* 2008, **7**(9):812-26.
- Iadecola C: **The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia.** *Acta Neuropathol* 2010.
- Mazighi M, Tanasescu R, Ducrocq X, Vicaut E, Bracard S, Houdart E, Woimant F: **Prospective study of symptomatic atherothrombotic intracranial stenoses: The GESICA study.** *Neurology* 2006, **66**(8):1187-91.
- Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Kasner SE, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG, Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Trial Investigators: **Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis.** *N Engl J Med* 2005, **352**(13):1305-16.
- Kern R, Steinke W, Daffertshofer M, Prager R, Hennerici M: **Stroke recurrences in patients with symptomatic vs asymptomatic middle cerebral artery disease.** *Neurology* 2005, 859-64.
- Kasner SE, Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG, Cloft HJ, Warfarin Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Trial Investigators: **Predictors of ischemic stroke in the territory of a symptomatic intracranial arterial stenosis.** *Circulation* 2006, **113**(4):555-63.
- Kasner SE, Lynn MJ, Chimowitz MI, Frankel MR, Howlett-Smith H, Hertzberg VS, Chaturvedi S, Levine SR, Stern BJ, Benesch CG, Jovin TG, Sila CA, Romano JG, Warfarin Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID) Trial Investigators: **Warfarin vs aspirin for symptomatic intracranial stenosis: Subgroup analyses from WASID.** *Neurology* 2006, **67**(7):1275-8.
- Derdeyn CP, Chimowitz MI: **Angioplasty and stenting for atherosclerotic intracranial stenosis: Rationale for a randomized clinical trial.** *Neuroimaging Clin N Am* 2007, **17**(3):355, 63, viii-ix.
- Arenillas JF, Candell-Riera J, Romero-Farina G, Molina CA, Chacon P, Aguade-Bruix S, Montaner J, de Leon G, Castell-Conesa J, Alvarez-Sabin J: **Silent myocardial ischemia in patients with symptomatic intracranial atherosclerosis: Associated factors.** *Stroke* 2005, **36**(6):1201-6.
- Hoshino A, Nakamura T, Enomoto S, Kawahito H, Kurata H, Nakahara Y, Ijichi T: **Prevalence of coronary artery disease in japanese patients with cerebral infarction: Impact of metabolic syndrome and intracranial large artery atherosclerosis.** *Circ J* 2008, **72**(3):404-8.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, *et al*: **From vulnerable plaque to vulnerable patient: A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I.** *Circulation* 2003, **108**(14):1664-72.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, *et al*: **From vulnerable plaque to vulnerable patient: A call for new definitions and risk assessment strategies: Part II.** *Circulation* 2003, **108**(15):1772-8.
- Marrugat J, Sala J: **New instruments, same risks.** *Rev Esp Cardiol* 2007, **60**(5):464-7.
- Huang HW, Guo MH, Lin RJ, Chen YL, Luo Q, Zhang Y, Wong KS: **Prevalence and risk factors of middle cerebral artery stenosis in asymptomatic residents in rongqi county, guangdong.** *Cerebrovasc Dis* 2007, **24**(1):111-5.
- Wong KS, Huang YN, Yang HB, Gao S, Li H, Liu JY, Liu Y, Tang A: **A door-to-door survey of intracranial atherosclerosis in liangbei county, china.** *Neurology* 2007, **68**(23):2031-4.
- Wong KS, Ng PW, Tang A, Liu R, Yeung V, Tomlinson B: **Prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis in high-risk patients.** *Neurology* 2007, **68**(23):2035-8.
- Bae HJ, Lee J, Park JM, Kwon O, Koo JS, Kim BK, Pandey DK: **Risk factors of intracranial cerebral atherosclerosis among asymptomatics.** *Cerebrovasc Dis* 2007, **24**(4):355-60.
- Alzamora MT, Baena-Diez JM, Sorribes M, Fores R, Toran P, Vicheto M, Pera G, Reina MD, Albaladejo C, Llusa J, Bundo M, Sancho A, Heras A, Rubies J, Arenillas JF, PERART study: **Peripheral arterial disease study (PERART): Prevalence and predictive values of asymptomatic peripheral arterial occlusive disease related to cardiovascular morbidity and mortality.** *BMC Public Health* 2007, 7:348.
- 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, VERIFICA Investigators: **Validity of an adaptation of the framingham cardiovascular risk function: The VERIFICA study.** *J Epidemiol Community Health* 2007, **61**(1):40-7.
- Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS, Zannad F, Zureik M: **Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). an update on behalf of the advisory board of the 3rd and 4th watching the risk symposium, 13th and 15th european stroke conferences, mannheim, germany, 2004, and brussels, belgium, 2006.** *Cerebrovasc Dis* 2007, **23**(1):75-80.
- Prabhakaran S, Rundek T, Ramos R, Elkind MS, Paik MC, Boden-Albala B, Sacco RL: **Carotid plaque surface irregularity predicts ischemic stroke: The northern manhattan study.** *Stroke* 2006, **37**(11):2696-701.
- Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler RE: **Carotid artery stenosis: Gray-scale and doppler US diagnosis—society of radiologists in ultrasound consensus conference.** *Radiology* 2003, **229**(2):340-6.

López-Cancio *et al.* *BMC Neurology* 2011, **11**:22  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/11/22>

Page 9 of 9

26. de Bray JM, Pasco A, Tranquart F, Papon X, Alecu C, Giraudeau B, Dubas F, Emile J: **Accuracy of color-doppler in the quantification of proximal vertebral artery stenoses.** *Cerebrovasc Dis* 2001, **11**(4):335-40.
27. Nedelmann M, Stolz E, Gerriets T, Baumgartner RW, Malferrari G, Seidel G, Kaps M, TCCS Consensus Group: **Consensus recommendations for transcranial color-coded duplex sonography for the assessment of intracranial arteries in clinical trials on acute stroke.** *Stroke* 2009, **40**(10):3238-44.
28. Lin SK, Ryu SJ, Chang YJ, Lee TH: **Clinical relevance of musical murmurs in color-coded carotid and transcranial duplex sonographies.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2006, **27**(7):1493-7.
29. Valaikiene J, Schuierer G, Ziemus B, Dietrich J, Bogdahn U, Schlachetzki F: **Transcranial color-coded duplex sonography for detection of distal internal carotid artery stenosis.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2008, **29**(2):347-53.
30. Valdueza JM, Schreiber SJ, Rohel JE, Klingebiel R: **Vascular pathology.** In *Neurosonology and Neuroimaging of Stroke. 2008th.* Edited by: Thieme Verlag G. Stuttgart: Thieme; 2008:76-96.
31. Ley-Pozo J, Ringelstein EB: **Noninvasive detection of occlusive disease of the carotid siphon and middle cerebral artery.** *Ann Neurol* 1990, **28**(5):640-7.
32. Röther J, Schwartz AS, Wentz K, Hennerici M: **Middle cerebral artery stenoses: Assessment by magnetic resonance angiography and transcranial doppler ultrasound.** *Cerebrovasc Dis* 1994, **4**:273-9.
33. Baumgartner RW, Mattle HP, Schroth G: **Assessment of  $\geq 50\%$  and  $< 50\%$  intracranial stenoses by transcranial color-coded duplex sonography.** *Stroke* 1999, **30**(1):87-92.
34. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, Degraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL, American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group, Cardiovascular Nursing Council, Clinical Cardiology Council, Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council, Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group, American Academy of Neurology. **Primary prevention of ischemic stroke: A guideline from the American Heart Association/American Stroke Association stroke council: Cosponsored by the atherosclerotic peripheral vascular disease interdisciplinary working group; cardiovascular nursing council; clinical cardiology council; nutrition, physical activity, and metabolism council; and the quality of care and outcomes research interdisciplinary working group: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline.** *Stroke* 2006, **37**(6):1583-633.
35. **Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis: executive committee for the asymptomatic carotid atherosclerosis study.** *JAMA* 1995, **273**(18):1421-8.
36. Wityk RJ, Lehman D, Klag M, Coresh J, Ahn H, Litt B: **Race and sex differences in the distribution of cerebral atherosclerosis.** *Stroke* 1996, **27**(11):1974-80.
37. Sacco RL, Kargman DE, Gu Q, Zamanillo MC: **Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. the northern manhattan stroke study.** *Stroke* 1995, **26**(1):14-20.
38. Wong KS, Huang YN, Gao S, Lam WW, Chan YL, Kay R: **Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke.** *Neurology* 1998, **50**(3):812-3.
39. Huang YN, Gao S, Li SW, Huang Y, Li JF, Wong KS, Kay R: **Vascular lesions in Chinese patients with transient ischemic attacks.** *Neurology* 1997, **48**(2):524-5.
40. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Chacon P, Montaner J, Rovira A, Ibarra B, Quintana M: **C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease.** *Stroke* 2003, **34**(10):2463-8.
41. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J: **Basic mechanisms in intracranial large-artery atherosclerosis: Advances and challenges.** *Cerebrovasc Dis* 2005, **20**(Suppl 2):75-83.
42. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Chacon P, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Delgado P, Rubiera M, Penalba A, Rovira A, Montaner J: **Progression of symptomatic intracranial large artery atherosclerosis is associated with a proinflammatory state and impaired fibrinolysis.** *Stroke* 2008, **39**(5):1456-63.
43. Arenillas JF, Molina CA, Chacon P, Rovira A, Montaner J, Coscojuela P, Sanchez E, Quintana M, Alvarez-Sabin J: **High lipoprotein (a), diabetes, and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis.** *Neurology* 2004, **63**(1):27-32.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/11/22/prepub>

doi:10.1186/1471-2377-11-22

**Cite this article as:** López-Cancio *et al.*: The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis Study (ASIA): rationale and design. *BMC Neurology* 2011 **11**:22.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



#### **4.2. ARTÍCULO 2:**

The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis Study (AsIA): prevalence and risk factors.

*Atherosclerosis* 2012 Mar; 221(1): 221-5.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)

## The Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis (AsIA) study: Prevalence and risk factors

E. López-Cancio<sup>a,\*</sup>, L. Dorado<sup>a</sup>, M. Millán<sup>a</sup>, S. Reverté<sup>a</sup>, A. Suñol<sup>a</sup>, A. Massuet<sup>b</sup>, A. Galán<sup>c</sup>, M.T. Alzamora<sup>d</sup>, G. Pera<sup>d</sup>, P. Torán<sup>d</sup>, A. Dávalos<sup>a</sup>, J.F. Arenillas<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurosciences, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Magnetic Resonance Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Primary Healthcare Research Support Unit Metropolitana Nord, ICS-IDIAP Jordi Gol, Mataró, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Stroke Unit, Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 August 2011

Received in revised form 1 December 2011

Accepted 14 December 2011

Available online 23 December 2011

## Keywords:

Asymptomatic intracranial atherosclerosis

Stroke primary prevention

Prevalence studies

Risk factors in epidemiology

## ABSTRACT

**Background and purpose:** The ongoing population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis (Barcelona-AsIA) study is a prospective study that plans to investigate the natural history of asymptomatic intracranial atherosclerosis (AsIA) in a Caucasian-Mediterranean population, which remains unknown until now. The present study aims to determine the prevalence of AsIA and associated risk factors in the final study cohort.

**Methods:** Crossover, population-based study of a representative sample (randomly selected from our reference population) older than 50 with a moderate-high vascular risk assessed by the vascular equation REGICOR and prior history of neither stroke nor ischemic heart disease. Anthropometric, demographic, clinical data and blood samples were collected at baseline. All individuals underwent a complete extracranial and transcranial color-coded duplex (TCCD) examination. TCCD criteria were used to identify and classify the degree of intracranial stenoses.

**Results:** A total of 933 subjects (64% men, mean age 66.3 years) were included in the study. One or more intracranial stenoses were detected at baseline in 80 subjects (8.6%) of whom 31 (3.3%) had moderate-severe lesions. The higher the REGICOR scores the greater the prevalence of AsIA (6.6%, 10.2% and 25% for REGICOR scores 5–9, 10–14 and  $\geq 15$ ,  $p < 0.001$ ). Diabetes (OR 2.95; 95% CI (1.68–5.18);  $p < 0.001$ ), age (OR 1.05; 95% CI (1.02–1.08);  $p = 0.001$ ) and hypertension (OR 1.78; 95% CI (1.02–3.13);  $p = 0.04$ ) were independently associated with any degree of AsIA, while diabetes (OR 2.85; 95% CI (1.16–6.96);  $p = 0.02$ ) and age kept independently associated with moderate-severe AsIA.

**Conclusion:** The prevalence of AsIA and moderate-severe AsIA in stroke-free Caucasians with a moderate-high vascular risk were 8.6% and 3.3% respectively. Diabetes and age were independently associated with moderate-severe AsIA.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Large artery intracranial atherosclerosis disease (ICAD) is a major public health problem as it is a major cause of ischemic stroke

worldwide [1] and consequently, a main cause of long-term disability and mortality. It may account for 8–10% of ischemic strokes in whites [2–4] and up to 50% in Oriental Asians [5,6]. Extended use of new non-invasive tests, like transcranial color-coded-duplex (TCCD), computed tomography angiography (CTA) or magnetic resonance angiography (MRA) have led to an increased number of studies involving an assessment of ICAD in the past two decades. Even so, ICAD is still an understudied disease when compared to extracranial atherosclerosis.

Atherosclerotic lesions develop silently over years until they become symptomatic. Identification of markers of latent ICAD could be useful in the setting of stroke primary prevention and may provide an opportunity for early preventive interventions [7,8]. Nevertheless, studies of natural history of ICAD from its asymptomatic stage are limited. Large population studies aimed

\* Corresponding author at: Departamento de Neurociencias, Secretaría 7<sup>a</sup> planta, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34 934978911; fax: +34 934978742.

E-mail addresses: [elencancio@gmail.com](mailto:elencancio@gmail.com) (E. López-Cancio), [lauritadb@yahoo.es](mailto:lauritadb@yahoo.es) (L. Dorado), [mmillan.germanstrias@gencat.cat](mailto:mmillan.germanstrias@gencat.cat) (M. Millán), [silvia.germanstrias@gmail.com](mailto:silvia.germanstrias@gmail.com) (S. Reverté), [annasunol@gmail.com](mailto:annasunol@gmail.com) (A. Suñol), [amassuet.idirmbadalona@gmail.com](mailto:amassuet.idirmbadalona@gmail.com) (A. Massuet), [agalan.germanstrias@gencat.cat](mailto:agalan.germanstrias@gencat.cat) (A. Galán), [maiteal2007@gmail.com](mailto:maiteal2007@gmail.com) (M.T. Alzamora), [gpera.bnm.ics@gencat.cat](mailto:gpera.bnm.ics@gencat.cat) (G. Pera), [ptoran.bnm.ics@gencat.cat](mailto:ptoran.bnm.ics@gencat.cat) (P. Torán), [adavalos.germanstrias@gencat.cat](mailto:adavalos.germanstrias@gencat.cat) (A. Dávalos), [juanarenillas@gmail.com](mailto:juanarenillas@gmail.com) (J.F. Arenillas).

to determine its prevalence and related vascular risk factors in stroke-free individuals have only been conducted in Asia [9–13].

To clarify the prevalence and natural history of asymptomatic ICAD in whites, we designed a population-based, prospective, long-term follow-up observational study called the Barcelona-AsIA study (Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis study), whose main objectives have been described elsewhere [14]. After having concluded the recruitment phase, the present study was conducted to determine the prevalence of asymptomatic intracranial atherostenoses in the final Barcelona-AsIA cohort and to identify risk factors associated with this condition.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study sample selection and inclusion criteria

Complete study protocol has been reported in detail elsewhere [14]. From our reference population of 600,000 inhabitants that are registered in a database of the Primary Care Information Technology System containing demographic and contact details of all subjects covered by our Public National Health System, an initial sample of 3010 subjects older than 50 years was randomly selected within the peripheral arterial disease (PERART) study [15]. This is an ongoing study coordinated in 28 primary health centers of our region that aims to study the prevalence and prognosis impact of peripheral artery disease. After phone contact and agreement to participate, subjects were given an appointment to perform an interview with Primary Care physicians. In this baseline visit, blood sample extraction and anthropometric measurements, including ankle–arm index, were performed. A validated questionnaire called Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease (MONICA)[16] was used to assess self-reported vascular risk factors, history of stroke/TIA and history of coronary disease (angina or myocardial infarction). This questionnaire has shown a >90% sensibility, specificity, VPP and VPN in assessment of cardiovascular disease. Moreover, clinical history recordings were also checked to confirm diagnoses of stroke/TIA and coronary disease (positive hospital discharging report and/or coded as CIE-10 164, G45, I20 or I25). REGICOR and Framingham vascular risk functions (see below) were thereafter calculated taking into account all the information obtained in the baseline visit.

From this initial random sample population included in PERART study, we selected all the 1503 subjects that met our inclusion criteria: (1) no history of stroke or transient ischemic attack; (2) no history of coronary disease (angina and/or myocardial infarction); (3) exposure to a moderate–high vascular risk, assessed by a REGICOR  $\geq 5$  (see below); (4) absence of institutionalization or severe disability.

All these subjects were first contacted by regular mail warning them about the AsIA project and the chance of being called to take part in it. Thereafter they were contacted by phone from our tertiary stroke center to confirm participation and to program the baseline visit in our center. Our study protocol was approved by the Ethics Committee of our institution.

### 2.2. Baseline procedures

All subjects accepting to participate were visited at our public health tertiary stroke center, the Germans Trias i Pujol University Hospital (Badalona, Barcelona, Spain). At baseline visit and after signing written informed consent, subjects underwent a complete questionnaire performed by a neurologist and including sociodemographic variables (age, sex, socioeconomic status, education status, and employment) and clinical variables (smoking and alcohol habits, physical activity level, personal and family history

of hypertension, diabetes and dyslipidemia, current drug intake, intermittent claudication, etc.). Hypertension, diabetes and dyslipidemia were defined based on personal history of these diagnoses and/or on current diet or medical treatment intake for these disorders. Smoking was considered to be present in current smokers or if the time interval since abstinence was <5 years. The neurologist also re-assessed personal history of coronary disease and stroke/TIA to exclude any incident case between PERART study sample selection and our baseline visit. Anthropometric variables were also measured (waist circumference, height, and weight) during this visit. Collected data was prospectively stored in paper Case Report Forms and also in the AsIA main electronic dataset (SPSS format). Fasting blood samples (serum, plasma and total blood) were drawn, processed and stored in a biobank at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After finishing the complete subject recruitment (June 2010), serum from this biobank was obtained and analyzed to measure fasting glycemia, cholesterol and triglyceride levels. Framingham and REGICOR scores were previously calculated within the PERART cohort study. REGICOR is the Framingham function adapted and validated for the Spanish population [17] and evaluates the 10-year risk (%) of having cardiovascular events based on a compute of traditional risk factors (sex, age, diabetes, smoking, blood pressure and cholesterol levels). REGICOR <5% indicates low risk, 5–9% moderate risk, 10–14% high risk and  $\geq 15\%$  very high risk [18]. Framingham and REGICOR scores had a very high correlation (Spearman coefficient, 0.98) in our population.

### 2.3. Diagnosis of intracranial stenosis

All ultrasonographic studies were performed at baseline in the same lab, by two experienced neurologists, with a General Electric Vivid/Pro (Horten, Norway). First, a complete duplex extracranial study was performed to determine the presence and grade of carotid and vertebral atherosclerosis. Significant carotid atherosclerosis was considered when the stenosis was  $\geq 50\%$  (peak systolic velocity > 125 cm/s)[19].

After that, a TCCD examination was set using contrast agents if necessary, by transtemporal and transforaminal windows, following consensus recommendations for an optimal exploration [20]. Intracranial stenosis was diagnosed following previous published criteria for TCCD [21]. First, color-mode is used to observe distribution and flow direction of the main intracranial arteries, looking for appearance of segmental narrowing of the color signal and/or color aliasing phenomena. After that, a complete spectral study is set along every artery, assessing not only focal increases in velocity but also the presence of spectral changes (low-frequency high-intensity signals, spectral widening or musical murmurs). Number, location and severity of intracranial stenosis were recorded in every subject. Stenosis severity by TCCD was classified following Baumgartner cut-off values of PSV for mild/moderate-severe stenosis [21]:  $\geq 155/\geq 220$  cm/s for middle cerebral artery;  $\geq 120/\geq 155$  cm/s for anterior cerebral artery;  $\geq 100/\geq 145$  cm/s for posterior cerebral and basilar arteries and  $\geq 90/\geq 120$  cm/s for vertebral artery.

Prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis (AsIA) was calculated based on neurosonological study, with the exception of 5 subjects with a poor quality TCCD study who underwent a complementary MRA study to rule out the diagnosis. Moderate-severe asymptomatic intracranial atherosclerosis was defined as having at least one moderate-severe stenosis by TCCD velocity criteria.

Subjects with moderate-severe intracranial stenosis detected by TCCD study at baseline were invited to undergo a MRA study with a 1.5 T Philips and a time-off-flight (TOF) sequence if no contraindications were present. All MRA studies were analyzed by a neuroradiologist blind to clinical and sonographic data.



#### 2.4. Statistical analyses

Statistics were performed with the SPSS 18.0 statistical package. Our sample calculation assumed that: (1) at least 50% of subjects older than 50 years in our population would have a REGICOR >5% [22]; (2) 10% of subjects would be excluded for failure to fulfill the inclusion criteria; (3) 20% of subjects would be uncontactable or refuse participation; (4) a prevalence of intracranial stenosis of 8%. To obtain this value, we assumed that the differences in prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis between Asians and Caucasians would be similar than those observed in symptomatic patients (around 3 to 4 times more prevalent in Asians). Thus, our expected prevalence was obtained by dividing the reported prevalence of asymptomatic intracranial stenosis in Asians of 24.5% [12] by three.

Accepting an alpha error of 0.05, a sample size of more than 900 individuals and a prevalence of intracranial stenosis of 8% ensured a statistical power of 80% to detect as statistical significant an odds ratio equal or higher than 2 in the study of risk factors associated to the presence of AsIA. Therefore, the projected sample size was around 1000 individuals with moderate-high vascular risk with neither prior stroke nor ischemic heart disease selected from 3010 subjects randomly included in the PERART study [14].

The association of vascular risk factors with the presence and severity of intracranial stenoses, was analyzed by Pearson's  $\chi^2$  test, Mann–Whitney test or Student's *t*-test when appropriate. Multivariate logistic regression models were performed to identify risk factors independently associated with the presence of asymptomatic intracranial atherostenoses of any degree, including in the model those variables with values of  $p < 0.20$  in previous univariate analysis. A multinomial regression analysis was conducted to identify the factors associated to the severity of intracranial atherosclerosis, comparing the groups without AsIA (reference group), with mild AsIA and with moderate-severe AsIA. Statistical significance was defined as  $p$  value < 0.05.

### 3. Results

Prospective subject enrolment took place between March 2007 and June 2010. From the initial random sample of 1503 subjects, 229 subjects were not located after 5 phone calls, 316 declined to participate for several reasons, 5 were excluded for having suffered a stroke after initial sample randomization and 20 died during the recruitment period. Finally, a total of 933 subjects were included in baseline visit at our center and comprise the final Barcelona–AsIA cohort. All subjects were of Spanish origin, with the exception of eight subjects natives of different Latino-American countries. Mean age was 66.3 years (8.1 SD) and 64% were males. Regarding vascular risk factors, 56% had hypertension, 39.5% had dyslipidemia, 27% were diabetic and 18% active smokers. Age, sex and vascular risk scores were similar between the final AsIA cohort and the group of subjects not located or who declined to participate, although mean age of not located subjects was lower, probably because phone calls were performed during working hours. Subjects who died during recruitment phase ( $n = 20$ ) were older and more frequently men (see supplemental Table e-1).

#### 3.1. Prevalence of asymptomatic intracranial atherostenoses

Asymptomatic intracranial atherostenoses were found at baseline in 80 out of 933 individuals. The prevalence of AsIA in the total population was 8.6% (95% CI, 6.8–10.4), and the prevalence of moderate-severe AsIA was 3.3% (95% CI, 2.1–4.4). Echo-contrast agents were used in 234 (25%) subjects due to a poor acoustic window.

Of those subjects with AsIA, 33 (41.3%) had a unique intracranial stenosis and 47 had two or more stenoses. A total of 187 intracranial stenoses were detected at baseline and were located as follows: 60 in terminal ICA/siphon, 55 in middle cerebral artery, 31 in anterior cerebral artery, 20 in posterior cerebral artery, 11 in vertebral artery and 10 in basilar artery. Regarding distribution of intracranial stenosis in each patient, 46 subjects (57.5%) had isolated anterior circulation stenosis, 11 (13.8%) had isolated posterior circulation stenosis and 23 (28.7%) showed stenoses in both anterior and posterior circulations.

In extracranial duplex study, 466 subjects (50%) were found to have one or more carotid plaques and 29 subjects (3.1%) had a significant internal carotid artery stenosis  $\geq 50\%$ .

Of the 31 subjects with moderate-severe intracranial stenoses detected by TCCD, only 23 gave informed consent to undergo a complementary MRA in the following 6 months that confirmed the presence of AsIA in 21 of them. The two subjects with no angiographic confirmation had both stenosis located in carotid siphon; after reviewing the MRA we considered the misdiagnosis due probably to movement and bone artifacts in the TOF sequence; moreover, both subjects underwent a new neurosonological study two years after inclusion that showed the same findings as in the first. For these reasons, these patients were considered as having AsIA. In one subject with a severe tandem extra-intracranial carotid stenosis a conventional arteriography was performed and confirmed both lesions.

#### 3.2. Risk factors associated with AsIA

Variables potentially associated with AsIA of any degree and with a moderate-severe degree are shown in Table 1. AsIA was significantly associated with age but not with sex. Vascular risk assessed by REGICOR and Framingham scores was also associated with the presence of asymptomatic intracranial atherosclerosis (Table 1). The higher the REGICOR scores the greater the prevalence of AsIA (6.6%, 10.2% and 25% for REGICOR scores 5–9, 10–14 and  $\geq 15$  respectively,  $p < 0.001$ , Fig. 1 online).

Regarding individual vascular risk factors, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia and higher fasting glycemia levels were significantly associated with the presence of any degree of AsIA. The median (IQR) duration of diabetes was 10 (5.5–20) years in the group with AsIA ( $n = 44$ ) and 5 (2–10) years in subjects without AsIA ( $n = 206$ ) ( $p < 0.001$ ). A multivariate logistic regression model including variables showing a  $p < 0.20$  in univariate analysis, identified diabetes (OR 2.95; 95% CI (1.68–5.18);  $p < 0.001$ ), age (OR 1.05; 95% CI (1.02–1.08);  $p = 0.001$ ) and hypertension (OR 1.78; 95% CI (1.02–3.13);  $p = 0.04$ ) as independently associated with AsIA (Table 2). Multinomial regression analysis showed that the factors independently associated with moderate-severe AsIA were age (OR 1.05; 95% CI (1.004–1.1);  $p = 0.03$ ) and diabetes (OR 2.85; 95% CI (1.16–6.96);  $p = 0.02$ ) (Table 3).

Prevalence of AsIA was progressively higher with the combination of the independent risk factors age and diabetes (mean age of the group with AsIA was used to divide the subjects): from 3.8% among those subjects <70 years and without diabetes to 21% among those with the two risk factors. Percentage of subjects with moderate-severe AsIA also increased across these groups (Fig. 2 online).

### 4. Discussion

The major finding of our study was that the prevalence of AsIA assessed by TCCD in a Caucasian population with moderate-severe vascular risk is estimated in 8.6%. Prevalence of moderate-severe AsIA (3.3%) was similar to prevalence of significant carotid stenosis

**Table 1**  
Comparison of vascular risk factors between subjects with and without asymptomatic intracranial atherosclerosis (AsIA).

	Without AsIA (n = 853)	AsIA: any degree (n = 80)	p	AsIA: moderate-severe (n = 31)	p <sup>a</sup>
Age	65.9 (±8.1)	69.9 (±8.4)	<0.001	69.7 (±9.7)	0.01
Male sex (%)	63.8	62.5	0.44	61.3	0.77
REGICOR score	7 (5–9)	9 (7–13)	<0.001	9 (7–11)	0.001
Framingham score	17 (13–25)	22 (16–32)	<0.001	21 (19–30)	0.003
Hypertension (%)	54.5	75.9	<0.001	80.6	0.004
Diabetes (%)	24.4	55.1	<0.001	61.3	<0.001
Dyslipidemia (%)	53.4	66.3	0.03	67.7	0.11
Smoking habit (%)	24.6	18.8	0.14	12.9	0.13
Alcohol intake (g/day)	9.6 (±15)	8.3 (±13)	0.78	9.7 (±11)	0.99
Alcohol >20 g/day (%)	12.3	8.8	0.34	12.9	0.92
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.3 (25.5–30.7)	28.5 (25.7–31.1)	0.53	28.2 (26.3–30.4)	0.92
Total cholesterol (mg/dl)	205.6 (±40)	204.8 (±43)	0.87	204.1 (±54)	0.84
HDL (mg/dl)	53 (46–60)	52 (46–62)	0.84	49 (44–64)	0.27
LDL (mg/dl)	131.1 (±35)	128.7 (±37.1)	0.57	126 (±47)	0.43
Triglycerides (mg/dl)	108 (82–156)	113 (80–151)	0.85	147 (94–184)	0.05
Fasting glycemia (mg/dl)	104 (95.2–118)	110 (98.9–138.2)	<0.001	125.2 (105.3–165.6)	<0.001
Current therapies use (baseline)					
Antihypertensives (%)	50.8	71.3	0.006	74.2	0.12
Hypoglycemics (%)	20.4	44.8	<0.001	58	<0.001
Hypolipemians (%)	38.9	46.3	0.07	48.4	0.12

Categorical variables presented in percentages. Continuous variables presented in mean (±SD) if normally distributed or median (interquartile range) in the rest. BMI: body mass index; HDL: high density cholesterol.

<sup>a</sup> Subjects with moderate-severe AsIA compared to those without AsIA.

**Table 2**  
Logistic regression analyses: factors independently associated with the presence of asymptomatic intracranial atherosclerosis (any degree).

	Crude OR (95% CI)	p	Adjusted OR <sup>a</sup> (95% CI)	p
Age	1.06 (1.03–1.09)	<0.001	1.05 (1.02–1.08)	0.001
Hypertension	2.68 (1.57–4.56)	<0.001	1.78 (1.02–3.13)	0.042
Diabetes	3.83 (2.4–6.12)	<0.001	2.95 (1.68–5.18)	<0.001
Dyslipidemia	1.71 (1.05–2.77)	0.029	1.44 (0.86–2.41)	0.159
Smoking	0.70 (0.39–1.26)	0.241	1.03 (0.55–1.91)	0.912
Fasting glycemia (mg/dl)	1.01 (1.004–1.015)	<0.001	1 (0.993–1.007)	0.98

OR: odds ratios; CI: confidence interval.

<sup>a</sup> Logistic regression model adjusted for diabetes, sex, age, hypertension, dyslipidemia, smoking habit and fasting glycemia.

(3.1%) in the same cohort. In previous Asian studies using transcranial Doppler (TCD), but using similar cut-off points of systolic peak velocity to define a stenosis, prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis ranged from 6 to 24.5% [9–12], depending on number of arteries assessed. Principal results of these studies are summarized in supplemental Table e-2 and compared to ours. In all these studies, subjects with poor acoustic windows were excluded of the analysis or classified as “non stenosis”, fact that could have led to an underestimation of the prevalence in stroke-free Asians. Contrary to Asian studies, we assessed intracranial and extracranial circulation globally and we used contrast agents to evaluate the whole sample. Therefore, according to our findings, asymptomatic intracranial atherosclerosis in Caucasians is not a rare entity and this finding could have important implications for general public health and for the design of primary prevention strategies in our setting.

From a primary prevention point of view, it is important to identify factors related to the presence of intracranial atherosclerosis in a stroke-free individual. In this setting, REGICOR

score has shown a good correlation with subclinical intracranial atherosclerosis burden in our population. One of every four subjects with a very high risk score (REGICOR ≥ 15) had intracranial stenosis. Regarding individual risk factors, three were independently associated with asymptomatic intracranial atherosclerosis of any degree: diabetes, age and hypertension. These three risk factors have also been described in the Asian studies mentioned before. Then, ethnic differences in the distribution of cerebral atherosclerosis between Asians and Caucasians may not be explained by a distinct vascular risk factor profile. These differences are probably related to other conditions, such as genetic, molecular or environmental factors. Further studies are needed to support this hypothesis. In this line, studies in stroke-free blacks and Hispanics (unreported until now) would be of great interest as they also have a higher prevalence of ICAD-stroke subtypes than Caucasians [3].

In our study, diabetes mellitus has appeared like the most relevant risk factor associated with AsIA of any degree and also with moderate-severe AsIA, similar as previously described in the symptomatic phase of the disease [4,23]. Furthermore, the

**Table 3**  
Multinomial regression analysis: severity of asymptomatic intracranial atherosclerosis and risk factors.

	Mild AsIA		Moderate-severe AsIA	
	Adjusted OR <sup>a</sup> (95% CI)	p	Adjusted OR <sup>a</sup> (95% CI)	p
Age (1 year)	1.06 (1.02–1.10)	0.004	1.05 (1.004–1.1)	0.034
Hypertension	–	0.140	–	0.106
Diabetes	3.21 (1.61–6.36)	0.001	2.85 (1.16–6.96)	0.022
Dyslipidemia	–	0.138	–	0.550
Triglycerides (mg/dl)	–	0.673	–	0.109
Fasting glycemia (mg/dl)	–	0.369	–	0.351

<sup>a</sup> Adjusted OR: age, hypertension, diabetes, dyslipidemia, triglycerides and fasting glycemia were introduced as covariables in the same multinomial regression analysis, using the group “without AsIA” as reference. OR: odds ratio. CI: confidence interval.

mean duration of the disease was significantly longer in diabetic patients with AsIA. We also found that higher levels of fasting glycemia and triglycerides, both related to insulin resistance, were significantly associated with moderate-severe AsIA. Diabetes may promote a more severe ICAD already from its early asymptomatic stage. Another important finding is that, in line with previous studies, some classical risk factors traditionally associated with carotid or coronary atherosclerosis like male sex, smoking habit or hypercholesterolemia, were not associated with intracranial atherosclerosis in our series. Intriguingly, we found a less smoking trend in patients with AsIA that has been previously reported either in the symptomatic or asymptomatic stage of intracranial atherosclerosis [4,10]. Intracranial arteries might have a different pattern of response to vascular deleterious stimuli as compared with other arterial beds. For instance, insulin resistance might promote a loss of the antioxidant potential of intracranial circulation favoring the development of atherosclerotic lesions in this location [24,25]. However, the basic mechanisms underlying this proneness of intracranial arteries to be selectively affected by diabetes remains largely unknown and deserves further study. Our projected AsIA-biomarker substudy may be able to shed some light into this issue.

To the best of our knowledge, this is the first large sample population-based study on asymptomatic intracranial atherosclerosis designed in a Caucasian population. However, our study has some limitations. First, as it was a cross-sectional study, evaluation of the real impact of risk factors in the development of intracranial atherosclerosis was not possible. Second, not all subjects with intracranial stenosis detected by TCCD underwent a simultaneous angiographic study to confirm the findings. However, the robust association of TCCD-detected intracranial stenoses with vascular risk factors supports the idea that they are true atherosclerotic stenoses. Finally, we did not obtain data on baseline creatinine clearance, so we may have missed the potential association of renal failure with the atherosclerotic burden.

In conclusion, the prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis (AsIA) of any degree among stroke free Caucasians with moderate-high vascular risk was 8.6%, whereas moderate-severe AsIA was present in 3.3% of studied subjects. Diabetes, age and hypertension were independent risk factors for AsIA, being only diabetes and age independently associated with moderate-severe AsIA. AsIA is not a rare entity, and this finding may have important implications for stroke primary prevention in our setting. The real prognostic significance of AsIA will be evaluated in the ongoing longitudinal phase of our study.

#### Sources of funding

This project is supported by the program of Promotion in the Biomedical Investigation and Health Sciences from the Carlos III Health Institute of the Spanish Health and Social Policy Ministry [PI070393] and Dr. López-Cancio is Granted with a Río Hortega Research Fellowship (ISC III).

#### Conflicts of interest

None

#### Acknowledgment

We gratefully thank investigators of PERART study as they provided us the randomized sample of subjects meeting criteria for our study.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.020.

#### References

- [1] Gorelick PB, Wong KS, Bae HJ, Pandey DK. Large artery intracranial occlusive disease: a large worldwide burden but a relatively neglected frontier. *Stroke* 2008;39:2396–9.
- [2] Wityk RJ, Lehman D, Klag M, et al. Race and sex differences in the distribution of cerebral atherosclerosis. *Stroke* 1996;27:1974–80.
- [3] Sacco RL, Kargman DE, Gu Q, Zamanillo MC. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. The Northern Manhattan stroke study. *Stroke* 1995;26:14–20.
- [4] Arenillas JF, Molina CA, Chacon P, et al. High lipoprotein (a), diabetes, and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology* 2004;63:27–32.
- [5] Wong KS, Huang YN, Gao S, et al. Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology* 1998;50:812–3.
- [6] De Silva DA, Woon FP, Lee MP, et al. South Asian patients with ischemic stroke: intracranial large arteries are the predominant site of disease. *Stroke* 2007;38:2592–4.
- [7] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003;108:1664–72.
- [8] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003;108:1772–8.
- [9] Wong KS, Ng PW, Tang A, et al. Prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis in high-risk patients. *Neurology* 2007;68:2035–8.
- [10] Wong KS, Huang YN, Yang HB, et al. A door-to-door survey of intracranial atherosclerosis in Liangbei County, China. *Neurology* 2007;68:2031–4.
- [11] Huang HW, Guo MH, Lin RJ, et al. Prevalence and risk factors of middle cerebral artery stenosis in asymptomatic residents in Rongqi County, Guangdong. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:111–5.
- [12] Bae HJ, Lee J, Park JM, et al. Risk factors of intracranial cerebral atherosclerosis among asymptomatics. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:355–60.
- [13] Uehara T, Tabuchi M, Mori E. Risk factors for occlusive lesions of intracranial arteries in stroke-free Japanese. *Eur J Neurol* 2005;12:218–22.
- [14] Lopez-Cancio E, Dorado L, Millan M, et al. The population-based Barcelona-asymptomatic intracranial atherosclerosis study (ASIA): rationale and design. *BMC Neurol* 2011;11:22.
- [15] Alzamora MT, Baena-Diez JM, Sorribes M, et al. PERART study. Peripheral arterial disease study (PERART): prevalence and predictive values of asymptomatic peripheral arterial occlusive disease related to cardiovascular morbidity and mortality. *BMC Public Health* 2007;7:348.
- [16] Baena-Diez JM, Alzamora-Sas MT, Grau M, et al. Validity of the MONICA cardiovascular questionnaire compared with clinical records. *Gac Sanit* 2009;23:519–25.
- [17] Marrugat J, Subirana I, Comin E, et al. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study. *J Epidemiol Community Health* 2007;61:40–7.
- [18] Marrugat J, Vila J, Baena-Diez JM, et al. Relative validity of the 10-year cardiovascular risk estimate in a population cohort of the REGICOR study. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:385–94.
- [19] Grant EG, Benson CB, Moneta GL, et al. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis – society of radiologists in ultrasound consensus conference. *Radiology* 2003;229:340–6.
- [20] Nedelmann M, Stolz E, Gerriets T, et al. TCCS consensus group consensus recommendations for transcranial color-coded duplex sonography for the assessment of intracranial arteries in clinical trials on acute stroke. *Stroke* 2009;40:3238–44.
- [21] Baumgartner RW, Mattle HP, Schroth G. Assessment of  $\geq 50\%$  and  $< 50\%$  intracranial stenoses by transcranial color-coded duplex sonography. *Stroke* 1999;30:87–92.
- [22] Baena Diez JM, del Val Garcia JL, Hector Salas Gaetgens L, et al. Comparison of the SCORE and REGICOR models for calculating cardiovascular risk in cardiovascular disease-free individuals at a healthcare center in Barcelona, Spain. *Rev Esp Salud Publica* 2005;79:453–64.
- [23] Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, et al. Progression of symptomatic intracranial large artery atherosclerosis is associated with a proinflammatory state and impaired fibrinolysis. *Stroke* 2008;39:1456–63.
- [24] D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, et al. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* 2001;32:2472–9.
- [25] Park HY, Kyeong-Ho Park DS, Lee HS, et al. Correlation between insulin resistance and intracranial atherosclerosis in patients with ischemic stroke without diabetes. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2008;17:401–5.



**5**

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

## 5.1. ESTUDIO DE BASE POBLACIONAL BARCELONA-ASIA (ASYMPTOMATIC INTRACRANIAL ATHEROSCLEROSIS STUDY): PUNTOS FUERTES, OBJETIVOS FUTUROS Y LIMITACIONES

El estudio Barcelona-AsIA es un estudio de base poblacional y prospectivo, que se diseñó con el fin de poder determinar la prevalencia e impacto pronóstico de la aterosclerosis intracraneal asintomática en población caucásica con un riesgo vascular intermedio o alto, así como para identificar los factores clínicos, biológicos y genéticos asociados a su presencia, progresión y expresión clínica. El diseño y el protocolo del estudio global se han presentado en la primera publicación de los resultados (*ARTÍCULO 1*). El diseño de la fase transversal se ha resumido además en el apartado de métodos de la presente tesis. De nuestra población de referencia se seleccionó una muestra aleatoria de sujetos mayores de 50 años y con un riesgo cardiovascular moderado-grave según la función REGICOR y se les invitó a participar en nuestro estudio. En la visita basal se recogieron datos clínicos y antropométricos, y se obtuvieron muestras sanguíneas para la creación de un biobanco. La presencia de aterosclerosis intra y extracraneal se evaluó mediante un estudio ultrasonológico. La mayoría de los sujetos fueron además sometidos a una evaluación neuropsicológica en la visita basal. En la fase longitudinal del estudio proyectada a 3 años, se registrará la aparición de eventos vasculares (cardíacos, cerebrales y/o de circulación periférica) en la población total del estudio.

El estudio de la aterosclerosis intracraneal en pacientes asintomáticos para enfermedad cerebrovascular, sometidos a un riesgo vascular moderado-alto, es interesante por varios motivos:

1. En primer lugar, desde el punto de vista epidemiológico, se desconoce la **prevalencia** de esta entidad en población caucásica, así como su relación con el riesgo vascular. Hasta el momento, los únicos estudios de base poblacional centrados en la aterosclerosis intracraneal asintomática se han realizado en China y Corea. Por otra parte, el origen de las marcadas diferencias raciales en la incidencia de la fase sintomática de esta enfermedad (ictus isquémico causado por la aterosclerosis intracraneal) es por ahora desconocido, por lo que el estudio de la fase asintomática de este proceso en diferentes poblaciones podría contribuir a dar luz a este hecho.

2. En segundo lugar, la población asintomática constituye el grupo ideal para estudiar los **mecanismos patogénicos especialmente implicados en el proceso de aterogénesis a nivel intracraneal**. Este hecho nos parece de una gran importancia, pues permitiría adecuar la estrategia terapéutica de prevención primaria a las características fisiopatológicas propias de la aterosclerosis intracraneal, con lo que se reduciría al máximo el riesgo de progresión y complicación de la enfermedad.
3. En tercer lugar, los mecanismos básicos que explican la **preferencia de la aterosclerosis por afectar determinados territorios** arteriales en cada individuo, en nuestro caso el intracraneal versus extracraneal, están poco estudiados. El estudio de los factores de riesgo y biomarcadores circulantes asociados a cada localización nos puede ayudar a entender los mecanismos fisiopatológicos “in vivo” implicados en el proceso de aterogénesis.
4. En cuarto lugar, se ignora la verdadera influencia que ejercen las lesiones ateroscleróticas intracraneales sobre el **pronóstico** de las personas asintomáticas expuestas a factores de riesgo vascular. En concreto, no se sabe hasta qué punto su presencia está relacionada con un mayor **riesgo de sufrir un ictus isquémico u otro evento vascular**, o bien con un mayor riesgo de desarrollar **deterioro cognitivo** en el futuro, comparado con personas de similares características clínicas con ausencia de estas lesiones.
5. En quinto lugar, la **población “en riesgo” asintomática** constituye el grupo ideal para evaluar los factores clínicos, moleculares y genéticos asociados a la presencia de aterosclerosis subclínica y a su riesgo de conversión en una fase sintomática a cualquier nivel. Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, las funciones clásicas de estratificación de riesgo vascular (Framingham, REGICOR) basadas en el cómputo de factores de riesgo presentes o no en el individuo, tienen muchas limitaciones cuando se utilizan de forma aislada y sobre todo en el grupo de riesgo vascular moderado, que es el más prevalente. Por eso hoy en día se hace mucho énfasis en el desarrollo de herramientas instrumentales, clínicas o analíticas que, de forma complementaria a las funciones de riesgo vascular, nos ayuden a detectar en la población a los pacientes que son verdaderamente “vulnerables” y a los cuales se deberían aplicar medidas preventivas estratégicas.

El estudio Barcelona-AsIA podrá dar respuesta a muchos de los puntos anteriormente expuestos. Más adelante en la presente tesis se expondrán con más detalle algunas de las conclusiones en referencia a los tres primeros puntos. Por otra parte, el diseño longitudinal de nuestro estudio, y gracias a la colaboración con el equipo de investigación en Atención Primaria que desarrolló el estudio PERART así como con el equipo de Neuropsicología, nos permitirá en un futuro evaluar el impacto pronóstico de la aterosclerosis intracraneal asintomática a largo plazo en la aparición de eventos vasculares y de deterioro cognitivo (*punto 4*). Además, dado que hemos utilizado herramientas validadas de estratificación de riesgo, como son el REGICOR, el cálculo del grosor íntima-media carotídeo y del índice tobillo-brazo, podremos analizar su utilidad junto con la detección de biomarcadores circulantes en la predicción de aterosclerosis subclínica y en la predicción de riesgo vascular en nuestra cohorte, facilitando el diseño de estrategias de prevención primaria específicas de nuestra población (*punto 5*). A todo ello es conveniente añadir que la creación de nuestro biobanco nos permitirá también estudiar muchos otros biomarcadores circulantes así como marcadores genéticos relevantes en función de los avances en la investigación científica.

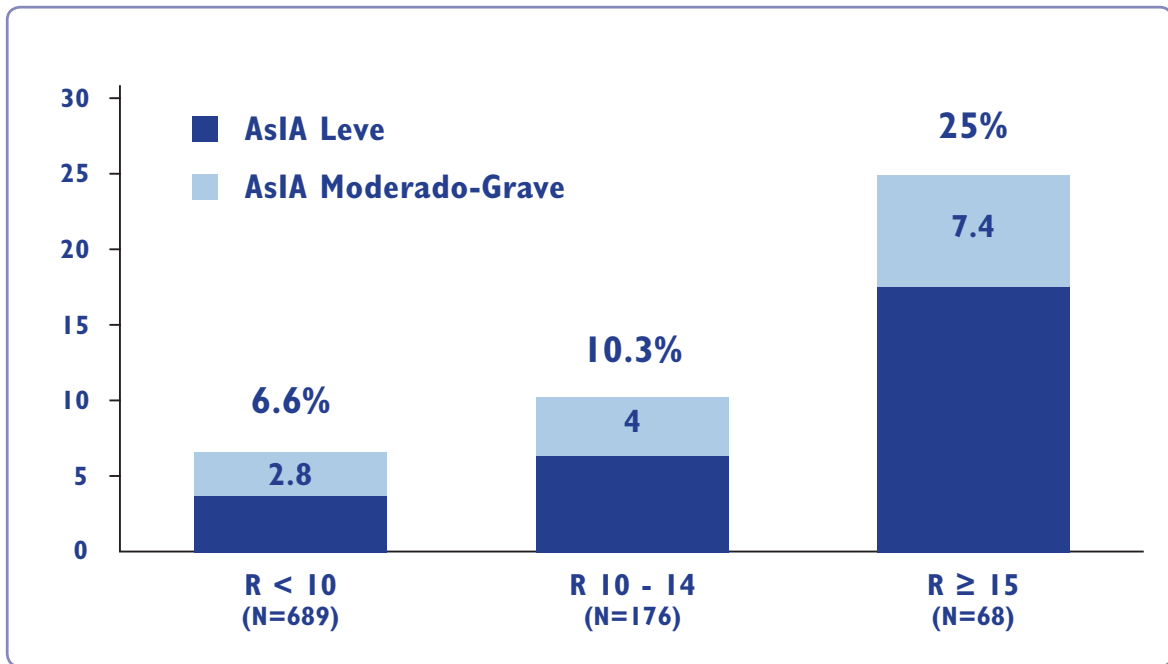
Por otra parte, es preciso comentar también las limitaciones del presente estudio. En primer lugar, el método seleccionado para realizar el *screening* de la aterosclerosis intracraneal, el dúplex transcraneal, es una herramienta barata y no invasiva, fácilmente aplicable a grandes estratos de la población. Sin embargo, su interpretación depende en gran medida de la experiencia del explorador y no existen criterios internacionales aceptados de forma universal para el diagnóstico de las estenosis intracraneales. En nuestro estudio hemos utilizado los únicos criterios publicados para el dúplex transcraneal y validados en relación a la arteriografía convencional (*gold standard*); estos criterios se basan en el pico de velocidad sistólica máxima y han mostrado una sensibilidad (S), especificidad (E) y valor predictivo positivo (VPP) del 100% y un valor predictivo negativo del (VPN) del 91-100% en la detección de estenosis >50% (moderadas-graves), y unos valores de S 94-100%, E 99-100%, VPP 73-100% y VPN 100% en la detección de estenosis intracraneales <50% (leves). Se recomienda habitualmente contrastar los hallazgos con otro método no invasivo, generalmente la angiografía por RM (ARM) o la angiografía por TC (ATC), aunque estas técnicas tampoco son de referencia. En nuestro estudio, la ARM sólo se realizó

en 60 de los 80 sujetos que presentaban estenosis intracraneales en el estudio basal. Los motivos por los que no se realizó en los otros 20 fueron los siguientes: 7 pacientes tenían claustrofobia, 3 tenían prótesis metálicas, 1 paciente portaba un marcapasos, 1 paciente falleció antes de la realización de la ARM y 8 sujetos decidieron voluntariamente no someterse a la exploración. En segundo lugar, otra limitación ya comentada en la introducción es que tanto el dúplex transcraneal como la ARM son técnicas que evalúan la existencia de una estenosis a partir del 30% de reducción de la luz. Sin embargo, podrían existir placas en las arterias intracraneales que no condicionasen estenosis inicialmente (por el remodelado positivo de la pared) y por tanto no ser detectadas con estos métodos. Esta evaluación difiere de la realizada en nuestro estudio en las arterias carótidas extracraneales, en las que, mediante dúplex y debido a la mejor calidad de la imagen (no existencia de ventana ósea interpuesta y mayor diámetro de la arteria), sí pueden visualizarse placas de ateroma en la pared que no ocasionan estenosis o son <30%. Por último, el escaso número de pacientes con estenosis intracraneales (n=80) limita la potencia del análisis estadístico en algunos subgrupos.



## 5.2. PREVALENCIA DE LA ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL ASINTOMÁTICA EN POBLACIÓN CAUCÁSICA Y FACTORES DE RIESGO VASCULAR ASOCIADOS: COMPARACIÓN CON ESTUDIOS EN POBLACIÓN ASIÁTICA

Este punto corresponde a los resultados presentados en el *ARTÍCULO 2*.



**Figura 15:** Prevalencia de aterosclerosis intracraneal asintomática (AsIA) y su gravedad en función del riesgo vascular medido por la función REGICOR (**R**), el cual se encuentra representado en el eje de abscisas.

En nuestra muestra de 933 individuos representativa de una población caucásica con riesgo vascular moderado-alto, detectamos en 80 sujetos la presencia de estenosis intracraneales en el estudio neurológico basal. Esto constituye una prevalencia del **8.6%** (IC 95% 6.8-10.4%). De los 80 sujetos, 31 presentaban al menos una estenosis intracraneal moderada-grave ( $\geq 50\%$ ), correspondiendo a una prevalencia del 3.3% (IC 95% 2.1-4.4). La mayoría de las estenosis se distribuyeron en la circulación anterior (ACM, carótida interna intracraneal, ACA) y la mayoría de los pacientes presentaban más de una estenosis en diferentes arterias. La prevalencia de aterosclerosis intracraneal y su gravedad aumentó progresivamente según el riesgo vascular calculado mediante la función REGICOR (*Figura 15*), de manera que 1 de cada 4 sujetos con un riesgo vascular muy alto (REGICOR > 15) presentaban aterosclerosis intracraneal. Los factores de riesgo que se asociaron de forma independiente a la presencia de

estenosis intracraneales de cualquier grado fueron la **edad**, la **hipertensión**, y la **diabetes**, siendo la edad y la diabetes los únicos asociados de forma independiente a la presencia de estenosis intracraneales de mayor gravedad. El antecedente de diabetes incrementó hasta 3 veces el riesgo de presencia de aterosclerosis intracraneal en nuestra cohorte (OR 2.95 (1.68-5.18),  $p < 0.001$ ).

	n	Sexo (% V)	Edad	Arterias exploradas	Punto corte VS (DTC)	Prevalencia	Factores de riesgo asociados
HW Huang China <sup>133</sup>	1.068	34.6	64.4±9.6	ACM	≥ 140 cm/s	5.9%	DM, HTA, edad, sexo varón
KS Wong China <sup>134</sup>	3.057	40.8	55.8±11	ACM	≥ 140 cm/s	12.6%	HTA, edad, DM, DL
Hee-Joon Bae Corea <sup>136</sup>	1228	40.1	58.1±11	Todas	No reportado	24.5% (global)	DM, HTA, edad
Lopez-Cancio España	933	64	66.3±8	Todas	≥ 155 cm/s	4.1% (ACM) 8.6% (global)	DM, HTA, edad

**Tabla 2 (VS: Velocidad Sistólica; DTC: Doppler Transcraneal)**

La prevalencia de aterosclerosis intracraneal en nuestra población fue menor que la reportada en los estudios realizados en población asiática en sujetos asintomáticos utilizando DTC<sup>133,134,136</sup>. En los estudios realizados en Asia cabe destacar que no se utilizó eco-contraste en casos con ventana acústica insuficiente, y que se incluyeron a estos sujetos en el grupo sin aterosclerosis intracraneal, lo cual podría haber supuesto un sesgo y una infra estimación de la prevalencia real en dichas poblaciones. En la *Tabla 2* se presentan las principales características de los diferentes estudios sobre prevalencia de aterosclerosis intracraneal asintomática, incluyendo el nuestro. En la primera y segunda filas se presentan los dos estudios realizados en China, el primero sobre la población general, y el segundo, sobre una población con presencia de al menos un factor de riesgo vascular. En estos dos estudios sólo se evaluó la presencia de estenosis en la arteria cerebral media (ACM). Como vemos en el segundo estudio, con una población de riesgo similar a la nuestra, la prevalencia de estenosis de la ACM fue tres veces superior (12.6% frente al 4.1% de prevalencia de estenosis de ACM en nuestra población, ver última fila). En el estudio Coreano (tercera fila), se evaluaron todas las arterias intracraneales, similar a nuestro estudio, y aquí la prevalencia fue también unas 3 veces superior a la nuestra (24.5% frente a 8.6% de prevalencia global en nuestro estudio).

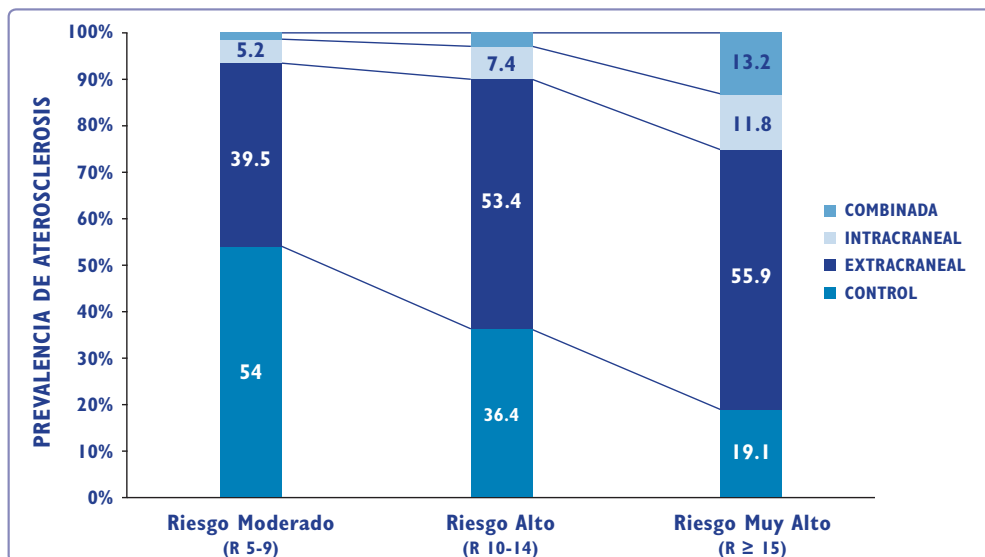
En cuanto a los factores de riesgo vascular asociados de forma independiente a la presencia de aterosclerosis intracraneal (ver última columna de la *Tabla 2*), la edad, la hipertensión y la diabetes son comunes en todas las poblaciones. La media de edad de nuestra población fue ligeramente más alta y también lo fue la proporción de varones. La proporción de sujetos diabéticos e hipertensos fue sustancialmente menor en el estudio Coreano en comparación con nuestro estudio (16.8% diabéticos y 31.8% hipertensos en el estudio Coreano, frente a 27% diabéticos y 56% hipertensos en nuestro estudio). Por tanto, las importantes diferencias raciales en la prevalencia de la aterosclerosis intracraneal no parecen estar ocasionadas por una diferente distribución de factores de riesgo entre poblaciones, siendo además los mismos factores (edad, diabetes e hipertensión) los que se asocian a la presencia de aterosclerosis intracraneal en todas las razas. Por tanto, deben existir otros factores ambientales, moleculares o genéticos que consigan explicarlas. En este sentido, sería también de gran interés conocer la prevalencia y factores asociados a la aterosclerosis intracraneal asintomática en poblaciones de raza negra y con ascendencia hispana (entendiéndose ésta como procedencia de un país latino-americano), ya que en estos grupos raciales-étnicos también se ha reportado una mayor incidencia de dicha enfermedad en su fase sintomática, como ya hemos comentado previamente en la introducción.

### 5.3. DIFERENTE PERFIL DE FACTORES DE RIESGO VASCULAR Y BIOMARCADORES CIRCULANTES EN LA DISTRIBUCIÓN EXTRA-INTRACRANEAL DE LA ATEROSCLEROSIS ASINTOMÁTICA: PAPEL DEL SÍNDROME METABÓLICO Y LA RESISTENCIA INSULÍNICA EN LA ATEROSCLEROSIS INTRACRANEAL

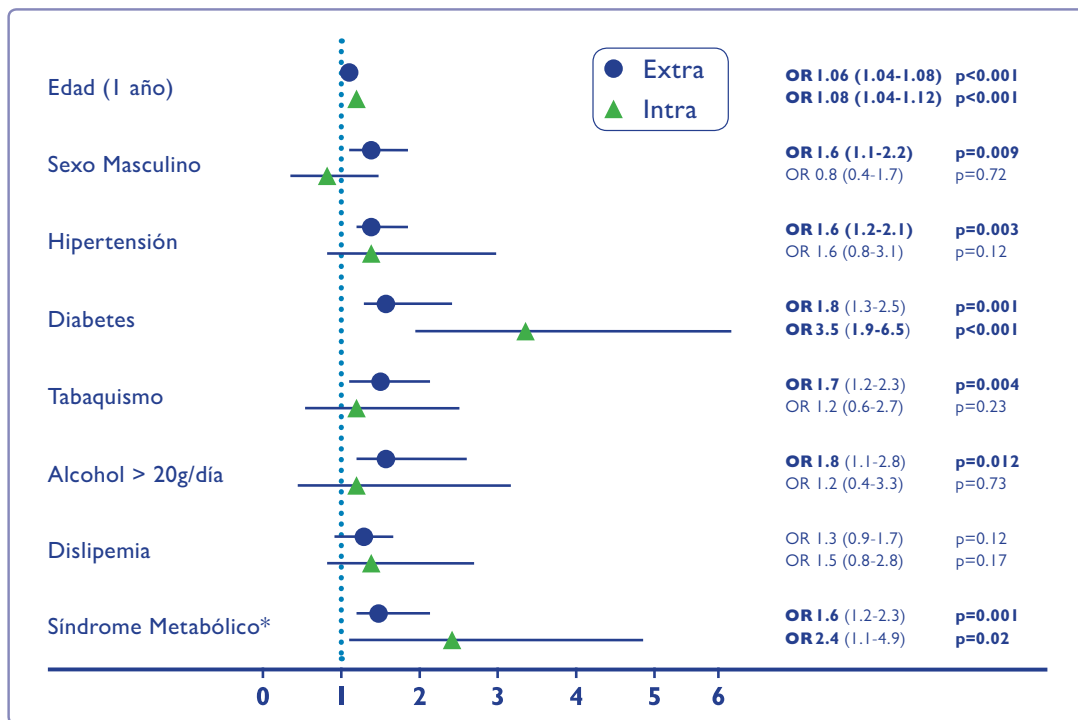
Este punto corresponde a los resultados presentados en el *ARTÍCULO 3 (ANEXO I)*.

En este trabajo de investigación, analizamos los factores asociados a la presencia y gravedad de aterosclerosis asintomática a diferentes niveles (extracraneal, intracraneal y combinada extra-intracraneal), tomando el grupo que no presentaba aterosclerosis al inicio como referencia (grupo control). Se estudiaron tres clases de factores: por un lado, los factores de riesgo vascular clásicos (edad, sexo, hipertensión, diabetes, tabaquismo...); por otro, “nuevos” factores de riesgo vascular como son la presencia de síndrome metabólico y la resistencia insulínica medida según el índice HOMA; y por último, se evaluó la asociación de cuatro biomarcadores relacionados con el proceso de aterogénesis, el ADMA, la PCR, la resistina y el PAI-I.

La prevalencia de aterosclerosis extracraneal, intracraneal y combinada determinada en el estudio neurológico basal aumentó de forma significativa en relación con el riesgo vascular global medido por la función REGICOR (*Figura 16*).

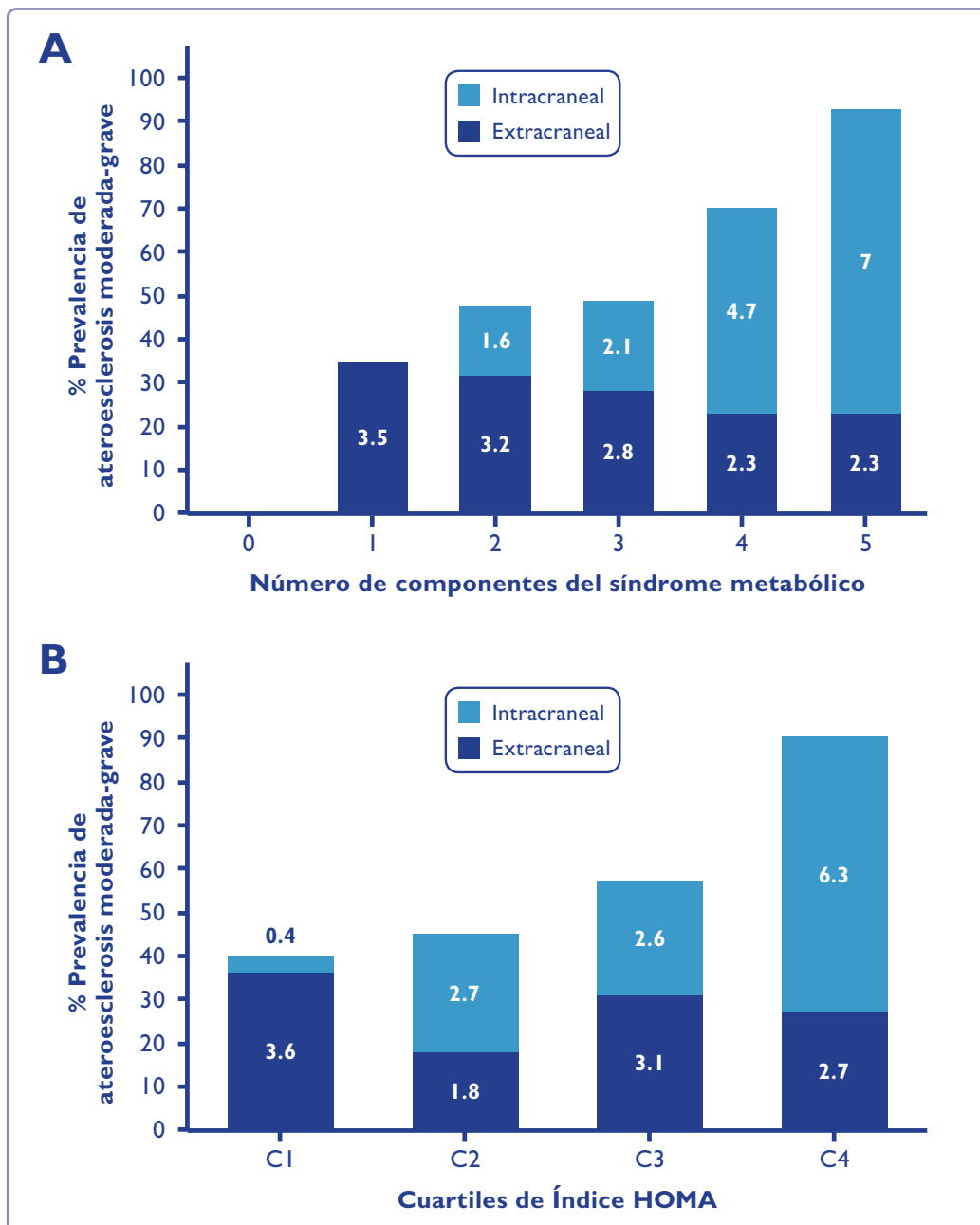


**Figura 16:** Prevalencia de aterosclerosis asintomática y su localización según el riesgo vascular REGICOR-R, representado en el eje de abscisas. Control: sujetos sin aterosclerosis



**Figura 17:** Análisis de regresión logística multinomial comparando los factores de riesgo asociado a cada localización. **Extra:** aterosclerosis extracraneal aislada. **Intra:** aterosclerosis intracraneal aislada. A la derecha, odds ratio e intervalos de confianza al 95% para cada factor de riesgo y localización

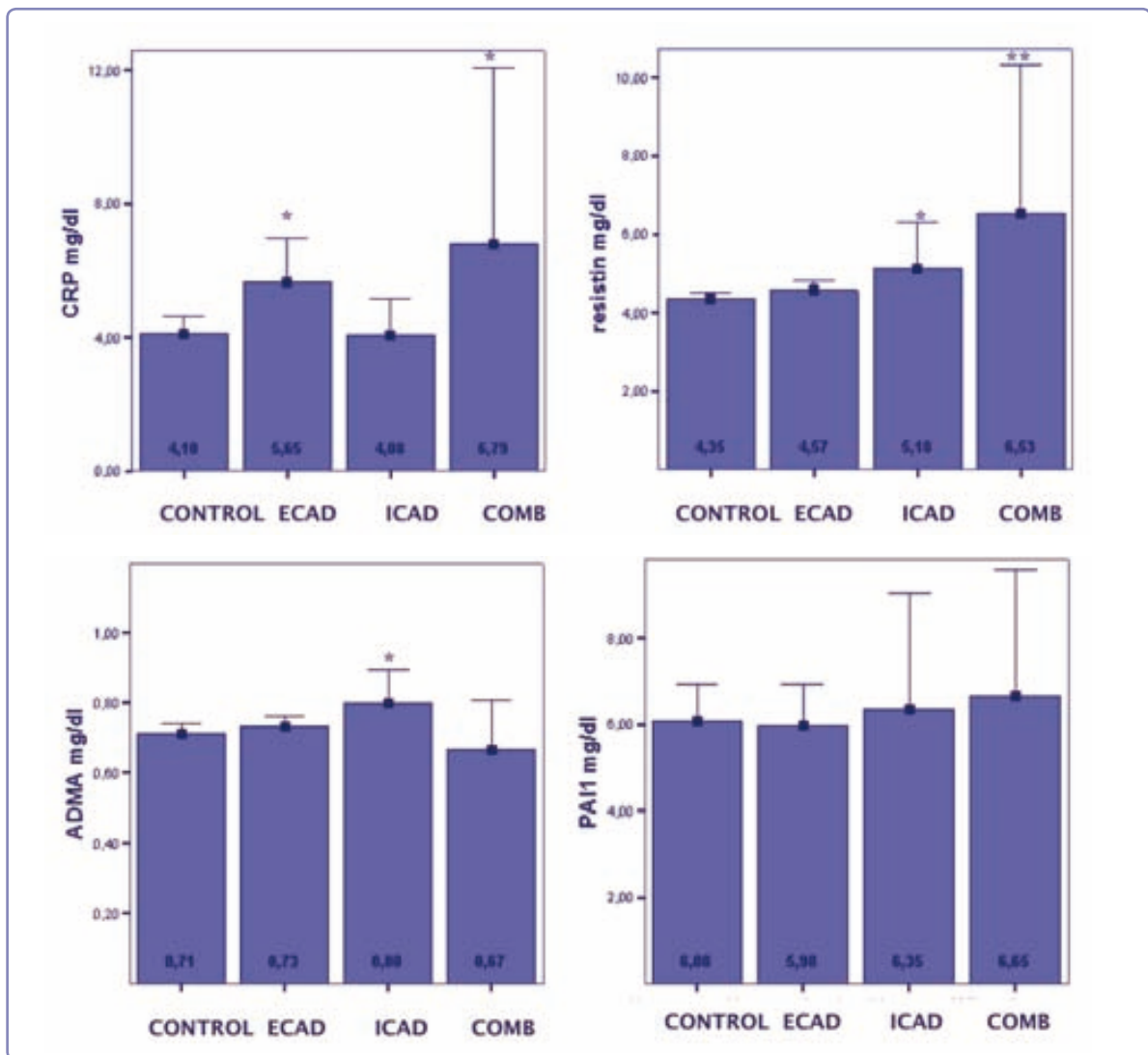
En el análisis de regresión logística multinomial evaluando los factores de riesgo clásico y el síndrome metabólico asociados con la presencia de aterosclerosis en cada localización, se observó un perfil de factores de riesgo diferente (Figura 17): así, la DM y la presencia de síndrome metabólico se asociaron de forma independiente a la presencia de aterosclerosis en cualquiera de las dos localizaciones, pero condicionaron un mayor riesgo para la presencia de aterosclerosis intracraneal. Además, algunos factores como el sexo masculino, el tabaquismo y el consumo de alcohol sólo se comportaron como factores de riesgo asociados la localización extracraneal y no a la intracraneal. En un segundo análisis teniendo en cuenta sólo las lesiones ateroscleróticas moderadas-graves (>50%) frente al grupo control sin aterosclerosis (Tabla 2 del ANEXO 1), la diabetes también fue un predictor para la presencia de aterosclerosis a cualquiera de los dos niveles, pero de nuevo la fuerza de la asociación fue mayor para la localización intracraneal. Además, la presencia de síndrome metabólico sólo se asoció a la existencia de estenosis moderadas-graves a nivel intracraneal y no a nivel extracraneal. El análisis de la resistencia insulínica (índice HOMA), que es la alteración bioquímica fundamental sobre la que gira el síndrome metabólico, corroboró estos resultados (Figura 18).



**Figura 18:** Prevalencia de aterosclerosis moderada-grave a nivel extra e intracraneal en la población total del estudio, en función del número de componentes del síndrome metabólico (A) y de los cuartiles ascendentes del índice HOMA (B)

En la figura puede observarse cómo la prevalencia de aterosclerosis intracraneal moderada-grave aumentó progresivamente en función del número de componentes del síndrome metabólico así como con el aumento progresivo del índice HOMA, mientras que la prevalencia de aterosclerosis extracraneal moderada-grave permaneció estable en estos grupos.

Por tanto, el síndrome metabólico y la resistencia insulínica juegan un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis intracraneal. Esta asociación ya había sido reportada previamente en relación a la fase sintomática de la enfermedad (ictus)<sup>99, 100, 101</sup>. Nuestros hallazgos confirman por primera vez que esta asociación ya está presente en la fase asintomática o subclínica de la aterosclerosis intracraneal.

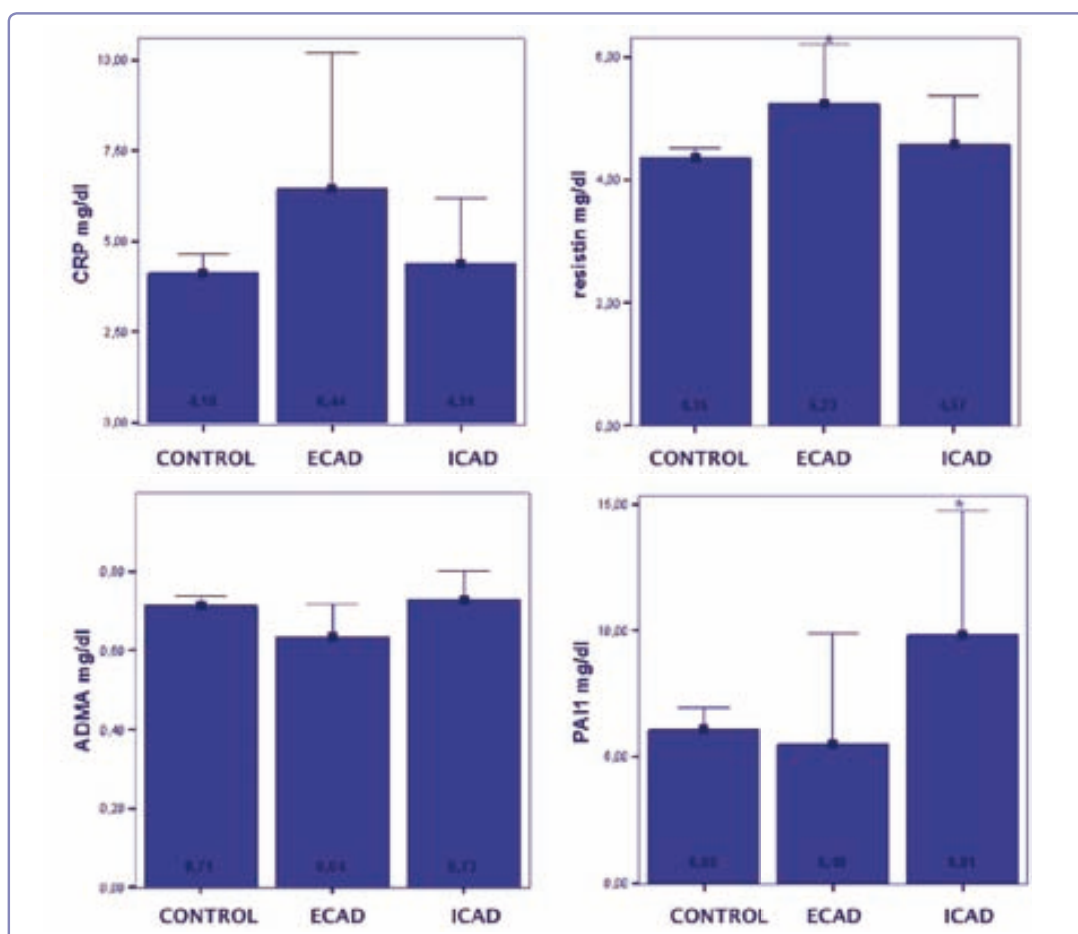


**Figura 19:** Biomarcadores circulares (medias e IC para la media) asociados a la localización de aterosclerosis subclínica de cualquier grado. **ECAD:** extracraneal; **ICAD:** intracraneal; **COMB:** combinada

(\* )  $p < 0.05$  respecto al grupo control (sin aterosclerosis).

Por último, en la *Figura 19* y en la *Figura 20* se presenta el análisis de biomarcadores asociados a cada localización de la aterosclerosis subclínica, y a su gravedad, respecto al grupo control (sin aterosclerosis). Los niveles elevados de PCR se asociaron a la localización extracraneal y combinada extra-intracraneal, aunque esta asociación no resistió el análisis multivariado. Estos resultados son similares a los ya repor-

tados en un estudio retrospectivo realizado en Japón<sup>147</sup>. Por otra parte observamos que los niveles elevados de resistina, una molécula inflamatoria nunca antes evaluada en relación a la aterosclerosis intracraneal, se asociaron a la localización intracraneal en su forma aislada y en su forma combinada con la extracraneal, resistiendo al ajuste multivariado sólo la asociación con la localización combinada extra-intracraneal. Los niveles elevados de ADMA, un marcador de disfunción endotelial, se asociaron de forma independiente a la presencia de aterosclerosis intracraneal aislada. Esta molécula tampoco había sido previamente estudiada en el ámbito de la aterosclerosis intracraneal. Estos hallazgos sugieren que en la aterosclerosis intracraneal juega un importante papel la disfunción endotelial mediada por la disminución de la secreción de óxido nítrico. Y por último, los niveles elevados de PAI-1, biomarcador asociado a la presencia de síndrome metabólico, se asociaron a la presencia de aterosclerosis intracraneal moderada-grave, aunque esta asociación no resistió al análisis multivariado (*Tabla 4 del ANEXO 1*).



**Figura 20:** Biomarcadores circulantes (medias e IC para la media) asociados a la localización de aterosclerosis subclínica moderada-grave. **ECAD:** extracraneal; **ICAD:** intracraneal.

(\*)  $p < 0.05$  respecto al grupo control (sin aterosclerosis).



#### 5.4. IMPLICACIONES DIRECTAS DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS

En primer lugar, la determinación de la prevalencia de la aterosclerosis intracraneal asintomática en población caucásica, ha contribuido a llenar un vacío existente en la literatura. Hemos observado que la prevalencia de esta entidad en nuestro medio no es infrecuente en una población con factores de riesgo vascular, en especial aquellos con edad avanzada, diabéticos e hipertensos. La comparación con los estudios realizados en Asia, donde la prevalencia de aterosclerosis intracraneal es sustancialmente mayor, nos ha permitido observar que los factores de riesgo vascular clásicos asociados a la presencia de aterosclerosis intracraneal en ambas poblaciones son idénticos. Este hallazgo sustenta la hipótesis de que deben existir factores genéticos que expliquen dichas diferencias raciales y justifica el estudio de los mismos en un futuro.

En segundo lugar, el hallazgo de los principales factores de riesgo asociados a la presencia y gravedad de la aterosclerosis intracraneal desde su fase asintomática (edad, diabetes mellitus, síndrome metabólico) nos ayudará a detectar qué sujetos en nuestra población están en riesgo de desarrollar esta patología. La resistencia a la insulina se perfila como un factor crítico en el desarrollo de la aterosclerosis intracraneal desde la etapa subclínica. Por motivos aún desconocidos, en presencia de resistencia a la insulina y sus alteraciones metabólicas asociadas, las arterias intracraneales parecen afectarse antes y en mayor grado que las extracraneales. Este hallazgo hace necesario continuar la investigación en esta línea, en busca de nuevas dianas terapéuticas relacionadas con la resistencia insulínica, con el objetivo de prevenir el desarrollo y complicaciones de esta entidad. Se desconoce por el momento qué implicación pronóstica tiene la presencia de la aterosclerosis intracraneal asintomática y es por eso que en la actualidad no existe ninguna guía de prevención primaria que haga referencia a las estrategias de cribado poblacional o a la aplicación de medidas de prevención primaria en esta patología. En la fase longitudinal del estudio AsIA podremos determinar el verdadero impacto pronóstico de la aterosclerosis intracraneal asintomática, por encima de la existencia de determinados factores de riesgo vascular, y podremos analizar si algún subgrupo de la población se podría beneficiar de la realización de una prueba diagnóstica no invasiva con el fin de detectar esta patología.

Por último, el hallazgo de un diferente perfil de factores de riesgo y molecular asociado a la distinta localización de la aterosclerosis cerebral, apoya la hipótesis de que las arterias intracraneales, desde un punto de vista fisiopatológico, parecen responder de una manera propia ante determinados estímulos aterogénicos.



**6**

## **CONCLUSIONES**

- 1. El diseño de este estudio prospectivo y de base poblacional ha permitido determinar la prevalencia de la aterosclerosis intracraneal asintomática en nuestro medio, así como los factores clínicos y biológicos asociados a su presencia. La fase longitudinal del estudio permitirá determinar su impacto pronóstico a largo plazo.**
  
- 2. La prevalencia de aterosclerosis intracraneal asintomática de cualquier grado en una población caucásica con un riesgo vascular moderado-alto y sin antecedentes de enfermedad cerebrovascular ni cardiopatía isquémica es del 8.6%, y la prevalencia de aterosclerosis intracraneal de grado moderado-grave del 3.3%.**
  
- 3. La edad, la diabetes, el síndrome metabólico y la resistencia insulínica se asociaron de forma independiente a la presencia de aterosclerosis intracraneal asintomática, y especialmente a la presencia de estenosis intracraneales de mayor grado.**
  
- 4. La concentración sérica elevada de ADMA se asoció de forma independiente a la presencia de aterosclerosis intracraneal asintomática aislada. Los niveles séricos altos de resistina se asociaron de forma independiente a la presencia de aterosclerosis intracraneal en combinación con la extracraneal.**



**7**

## **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Keele KD. Leonardo da Vinci's views on arteriosclerosis. *Med Hist* . 1973;17:304-308.
- (2) Aschof L. Observations concerning the relationship between cholesterol metabolism and vascular disease. *Br Med J* . 1932;2:1131-1134.
- (3) Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W,Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* . 1992;85:391-405.
- (4) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W,Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* . 1994;89:2462-2478.
- (5) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W,Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* . 1995;92:1355-1374.
- (6) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* . 1999;340:115-126.
- (7) Lehoux S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovasc Res* . 2006;71:269-279.
- (8) Tanaka K, Masuda J, Imamura T, Sueishi K, Nakashima T, Sakurai I, Shozawa T, Hosoda Y, Yoshida Y, Nishiyama Y. A nation-wide study of atherosclerosis in infants, children and young adults in Japan. *Atherosclerosis* . 1988;72:143-156.
- (9) Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L, Jacobson M, Mahoney L, Mietus-Snyder M, Rocchini A, Steinberger J, McCrindle B, American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* . 2009;54:919-950.
- (10) Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation* . 1998;98:2334-2351.
- (11) Badimon JJ, Ibanez B, Cimmino G. Genesis and dynamics of atherosclerotic lesions: implications for early detection. *Cerebrovasc Dis* . 2009;27 Suppl 1:38-47.
- (12) Bonow RO, Smaha LA, Smith SC,Jr, Mensah GA, Lenfant C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation* . 2002;106:1602-1605.
- (13) Smith SC,Jr. Reducing the global burden of ischemic heart disease and stroke: a challenge for the cardiovascular community and the United Nations. *Circulation* . 2011;124:278-279.
- (14) Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* . 1998;97:1837-1847.

- (15) D'Agostino RB S, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P, CHD Risk Prediction Group. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA* . 2001;286:180-187.
- (16) Marrugat J, Subirana I, Comin E, Cabezas C, Vila J, Elosua R, Nam BH, Ramos R, Sala J, Solanas P, Cordon F, Gen-Badia J, D'Agostino RB, VERIFICA Investigators. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study. *J Epidemiol Community Health* . 2007;61:40-47.
- (17) Marrugat J, Vila J, Baena-Diez JM, Grau M, Sala J, Ramos R, Subirana I, Fito M, Elosua R. Relative validity of the 10-year cardiovascular risk estimate in a population cohort of the REGICOR study. *Rev Esp Cardiol* . 2011;64:385-394.
- (18) Grau M, Marrugat J. Risk functions and the primary prevention of cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol* . 2008;61:404-416.
- (19) Lauer MS. Primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: the high public burden of low individual risk. *JAMA* . 2007;297:1376-1378.
- (20) Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* . 2003;108:1664-1672.
- (21) Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* . 2003;108:1772-1778.
- (22) Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Jamieson MJ, Kaul S, Berman D, Fayad Z, Budof MJ, Rumberger J, Naqvi TZ, Shaw LJ, Faergeman O, Cohn J, Bahr R, Koenig W, Demirovic J, Arking D, Herrera VL, Badimon J, Goldstein JA, Rudy Y, Airaksinen J, Schwartz RS, Riley WA, Mendes RA, Douglas P, Shah PK, SHAPE Task Force. From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am J Cardiol* . 2006;98:2H-15H.
- (23) Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol* . 2006;47:C19-31.

- (24) Morrison AC, Bare LA, Chambless LE, Ellis SG, Malloy M, Kane JP, Pankow JS, Devlin JJ, Willerson JT, Boerwinkle E. Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* . 2007;166:28-35.
- (25) Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA* . 2004;291:210-215.
- (26) Okwuosa TM, Greenland P, Ning H, Liu K, Bild DE, Burke GL, Eng J, Lloyd-Jones DM. Distribution of coronary artery calcium scores by Framingham 10-year risk strata in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) potential implications for coronary risk assessment. *J Am Coll Cardiol* . 2011;57:1838-1845.
- (27) Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, Volcik K, Boerwinkle E, Ballantyne CM. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol* . 2010;55:1600-1607.
- (28) Ankle Brachial Index Collaboration, Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, Folsom AR, Hirsch AT, Dramaix M, deBacker G, Wautrecht JC, Kornitzer M, Newman AB, Cushman M, Sutton-Tyrrell K, Fowkes FG, Lee AJ, Price JF, d'Agostino RB, Murabito JM, Norman PE, Jamrozik K, Curb JD, Masaki KH, Rodriguez BL, Dekker JM, Bouter LM, Heine RJ, Nijpels G, Stehouwer CD, Ferrucci L, McDermott MM, Stoffers HE, Hooi JD, Knottnerus JA, Ogren M, Hedblad B, Wittteman JC, Breteler MM, Hunink MG, Hofman A, Criqui MH, Langer RD, Fronck A, Hiatt WR, Hamman R, Resnick HE, Guralnik J, McDermott MM. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA* . 2008;300:197-208.
- (29) Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budof MJ, Fayad ZA, Foster E, Hlatky MA, Hodgson JM, Kushner FG, Lauer MS, Shaw LJ, Smith SC, Jr, Taylor AJ, Weintraub WS, Wenger NK, Jacobs AK, American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* . 2010;122:2748-2764.
- (30) Bild DE, Bluemke DA, Burke GL, Detrano R, Diez Roux AV, Folsom AR, Greenland P, Jacob DR, Jr, Kronmal R, Liu K, Nelson JC, O'Leary D, Saad MF, Shea S, Szklo M, Tracy RP. Multi-ethnic study of atherosclerosis: objectives and design. *Am J Epidemiol* . 2002;156:871-881.
- (31) Zeb I, Budof MJ. MESA: the NIH-sponsored study that validates atherosclerosis imaging for primary prevention. *Curr Atheroscler Rep* . 2011;13:353-358.
- (32) Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, Kumar A, Ference B, Afonso L. Association of novel biomarkers with future cardiovascular events is influenced by ethnicity: Results from a multi-ethnic cohort. *Int J Cardiol* . 2012.
- (33) Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart* . 1999;82:265-268.
- (34) Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* . 2001;103:934-940.

- (35) Ibanez B, Badimon JJ, Garcia MJ. Diagnosis of atherosclerosis by imaging. *Am J Med* . 2009;122:S15-25.
- (36) Nissen SE. Who is at risk for atherosclerotic disease? Lessons from intravascular ultrasound. *Am J Med* . 2002;112 Suppl 8A:27S-33S.
- (37) Prabhakaran S, Rundek T, Ramas R, Elkind MS, Paik MC, Boden-Albala B, Sacco RL. Carotid plaque surface irregularity predicts ischemic stroke: the northern Manhattan study. *Stroke* . 2006;37:2696-2701.
- (38) Partovi S, Loebe M, Aschwanden M, Baldi T, Jager KA, Feinstein SB, Staub D. Contrast-enhanced ultrasound for assessing carotid atherosclerotic plaque lesions. *AJR Am J Roentgenol* . 2012;198:W13-9.
- (39) Cai J, Hatsukami TS, Ferguson MS, Kerwin WS, Saam T, Chu B, Takaya N, Polissar NL, Yuan C. In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology. *Circulation* . 2005;112:3437-3444.
- (40) Chalela JA. Evaluating the carotid plaque: going beyond stenosis. *Cerebrovasc Dis* . 2009;27 Suppl 1:19-24.
- (41) Rudd JH, Narula J, Strauss HW, Virmani R, Machac J, Klimas M, Tahara N, Fuster V, Warburton EA, Fayad ZA, Tawakol AA. Imaging atherosclerotic plaque inflammation by fluorodeoxyglucose with positron emission tomography: ready for prime time? *J Am Coll Cardiol* . 2010;55:2527-2535.
- (42) Joshi F, Rosenbaum D, Bordes S, Rudd JH. Vascular imaging with positron emission tomography. *J Intern Med* . 2011;270:99-109.
- (43) Glaudemans AW, Slart RH, Bozzao A, Bonanno E, Arca M, Dierckx RA, Signore A. Molecular imaging in atherosclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* . 2010;37:2381-2397.
- (44) Muntendam P, McCall C, Sanz J, Falk E, Fuster V, High-Risk Plaque Initiative. The BioImage Study: novel approaches to risk assessment in the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease--study design and objectives. *Am Heart J* . 2010;160:49-57.e1.
- (45) Faraci FM, Heistad DD. Regulation of cerebral blood vessels by humoral and endothelium-dependent mechanisms. Update on humoral regulation of vascular tone. *Hypertension* . 1991;17:917-922.
- (46) Nixon AM, Gunel M, Sumpio BE. The critical role of hemodynamics in the development of cerebral vascular disease. *J Neurosurg* . 2010;112:1240-1253.
- (47) Masuoka T, Hayashi N, Hori E, Kuwayama N, Ohtani O, Endo S. Distribution of internal elastic lamina and external elastic lamina in the internal carotid artery: possible relationship with atherosclerosis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* . 2010;50:179-182.
- (48) Zervas NT, Liszczak TM, Mayberg MR, Black PM. Cerebrospinal fluid may nourish cerebral vessels through pathways in the adventitia that may be analogous to systemic vasa vasorum. *J Neurosurg* . 1982;56:475-481.
- (49) McCarron RM, Chen Y, Tomori T, Strasser A, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M. Endothelial-mediated regulation of cerebral microcirculation. *J Physiol Pharmacol* . 2006;57 Suppl 11:133-144.



- (50) Napoli C, Witztum JL, de Nigris F, Palumbo G, D'Armiento FP, Palinski W. Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. *Circulation* . 1999;99:2003-2010.
- (51) D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi DM, D'Armiento MR, Crimi G, Abete P, Palinski W, Condorelli M, Napoli C. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* . 2001;32:2472-2479.
- (52) Napoli C, Paterno R, Faraci FM, Taguchi H, Postiglione A, Heistad DD. Mildly oxidized low-density lipoprotein impairs responses of carotid but not basilar artery in rabbits. *Stroke* . 1997;28:2266-71; discussion 2271-2.
- (53) Samuels OB, Joseph GJ, Lynn MJ, Smith HA, Chimowitz MI. A standardized method for measuring intracranial arterial stenosis. *AJNR Am J Neuroradiol* . 2000;21:643-646.
- (54) Ley-Pozo J, Ringelstein EB. Noninvasive detection of occlusive disease of the carotid siphon and middle cerebral artery. *Ann Neurol* . 1990;28:640-647.
- (55) Baumgartner RW, Mattle HP, Schroth G. Assessment of  $\geq 50\%$  and  $< 50\%$  intracranial stenoses by transcranial color-coded duplex sonography. *Stroke* . 1999;30:87-92.
- (56) Zhao L, Barlinn K, Sharma VK, Tsivgoulis G, Cava LF, Vasdekis SN, Teoh HL, Triantafyllou N, Chan BP, Sharma A, Voumvourakis K, Stamboulis E, Saqqur M, Harrigan MR, Albright KC, Alexandrov AV. Velocity criteria for intracranial stenosis revisited: an international multicenter study of transcranial Doppler and digital subtraction angiography. *Stroke* . 2011;42:3429-3434.
- (57) Hirai T, Korogi Y, Ono K, Nagano M, Maruoka K, Uemura S, Takahashi M. Prospective evaluation of suspected stenooclusive disease of the intracranial artery: combined MR angiography and CT angiography compared with digital subtraction angiography. *AJNR Am J Neuroradiol* . 2002;23:93-101.
- (58) Duf s EJ, Jethwa P, Gupta G, Bonello K, Gandhi CD, Prestigiacomo CJ. Accuracy of Computed Tomographic Angiography Compared to Digital Subtraction Angiography in the Diagnosis of Intracranial Stenosis and its Impact on Clinical Decision-making. *J Stroke Cerebrovasc Dis* . 2012.
- (59) Chen XY, Wong KS, Lam WW, Zhao HL, Ng HK. Middle cerebral artery atherosclerosis: histological comparison between plaques associated with and not associated with infarct in a postmortem study. *Cerebrovasc Dis* . 2008;25:74-80.
- (60) Lammie GA, Sandercock PA, Dennis MS. Recently occluded intracranial and extracranial carotid arteries. Relevance of the unstable atherosclerotic plaque. *Stroke* . 1999;30:1319-1325.
- (61) Meyers PM, Schumacher HC, Gray WA, Fifi J, Gaudet JG, Heyer EJ, Chong JY. Intravascular ultrasound of symptomatic intracranial stenosis demonstrates atherosclerotic plaque with intraplaque hemorrhage: a case report. *J Neuroimaging* . 2009;19:266-270.
- (62) Zacharatos H, Hassan AE, Qureshi AI. Intravascular ultrasound: principles and cerebrovascular applications. *AJNR Am J Neuroradiol* . 2010;31:586-597.

- (63) Fayad ZA, Fallon JT, Shinnar M, Wehrli S, Dansky HM, Poon M, Badimon JJ, Charlton SA, Fisher EA, Breslow JL, Fuster V. Noninvasive In vivo high-resolution magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions in genetically engineered mice. *Circulation* . 1998;98:1541-1547.
- (64) Xu WH, Li ML, Gao S, Ni J, Zhou LX, Yao M, Peng B, Feng F, Jin ZY, Cui LY. In vivo high-resolution MR imaging of symptomatic and asymptomatic middle cerebral artery atherosclerotic stenosis. *Atherosclerosis* . 2010;212:507-511.
- (65) Turan TN, Bonilha L, Morgan PS, Adams RJ, Chimowitz MI. Intraplaque Hemorrhage in Symptomatic Intracranial Atherosclerotic Disease. *J Neuroimaging* . 2009.
- (66) Klein IF, Lavalley PC, Mazighi M, Schouman-Claeys E, Labreuche J, Amarenco P. Basilar artery atherosclerotic plaques in paramedian and lacunar pontine infarctions: a high-resolution MRI study. *Stroke* . 2010;41:1405-1409.
- (67) van der Kolk AG, Zwanenburg JJ, Brundel M, Biessels GJ, Visser F, Luijten PR, Hendrikse J. Intracranial vessel wall imaging at 7.0-T MRI. *Stroke* . 2011;42:2478-2484.
- (68) Xu WH, Li ML, Gao S, Ni J, Yao M, Zhou LX, Peng B, Feng F, Jin ZY, Cui LY. Middle cerebral artery intraplaque hemorrhage: prevalence and clinical relevance. *Ann Neurol* . 2012;71:195-198.
- (69) Wong KS, Gao S, Chan YL, Hansberg T, Lam WW, Droste DW, Kay R, Ringelstein EB. Mechanisms of acute cerebral infarctions in patients with middle cerebral artery stenosis: a diffusion-weighted imaging and microemboli monitoring study. *Ann Neurol* . 2002;52:74-81.
- (70) Arenillas JF, Molina CA, Chacon P, Rovira A, Montaner J, Coscojuela P, Sanchez E, Quintana M, Alvarez-Sabin J. High lipoprotein (a), diabetes, and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology* . 2004;63:27-32.
- (71) Wityk RJ, Lehman D, Klag M, Coresh J, Ahn H, Litt B. Race and sex differences in the distribution of cerebral atherosclerosis. *Stroke* . 1996;27:1974-1980.
- (72) Sacco RL, Kargman DE, Gu Q, Zamanillo MC. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* . 1995;26:14-20.
- (73) Weimar C, Goertler M, Harms L, Diener HC. Distribution and outcome of symptomatic stenoses and occlusions in patients with acute cerebral ischemia. *Arch Neurol* . 2006;63:1287-1291.
- (74) De Silva DA, Woon FP, Lee MP, Chen CP, Chang HM, Wong MC. South Asian patients with ischemic stroke: intracranial large arteries are the predominant site of disease. *Stroke* . 2007;38:2592-2594.
- (75) Wong KS, Huang YN, Gao S, Lam WW, Chan YL, Kay R. Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology* . 1998;50:812-813.
- (76) Gorelick PB, Wong KS, Bae HJ, Pandey DK. Large artery intracranial occlusive disease: a large worldwide burden but a relatively neglected frontier. *Stroke* . 2008;39:2396-2399.
- (77) Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P, World Federation of Neurology Dementia Research Group. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* . 2008;7:812-826.

- (78) Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol* . 2010.
- (79) Roher AE, Esh C, Kokjohn TA, Kalback W, Luehrs DC, Seward JD, Sue LI, Beach TG. Circle of willis atherosclerosis is a risk factor for sporadic Alzheimer's disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2003;23:2055-2062.
- (80) Kalback W, Esh C, Castano EM, Rahman A, Kokjohn T, Luehrs DC, Sue L, Cisneros R, Gerber F, Richardson C, Bohrmann B, Walker DG, Beach TG, Roher AE. Atherosclerosis, vascular amyloidosis and brain hypoperfusion in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *Neurol Res* . 2004;26:525-539.
- (81) Roher AE, Garami Z, Alexandrov AV, Kokjohn TA, Esh CL, Kalback WM, Vedders LJ, Wilson JR, Sabbagh MN, Beach TG. Interaction of cardiovascular disease and neurodegeneration: transcranial Doppler ultrasonography and Alzheimer's disease. *Neurol Res* . 2006;28:672-678.
- (82) Beach TG, Wilson JR, Sue LI, Newell A, Poston M, Cisneros R, Pandya Y, Esh C, Connor DJ, Sabbagh M, Walker DG, Roher AE. Circle of Willis atherosclerosis: association with Alzheimer's disease, neuritic plaques and neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* . 2007;113:13-21.
- (83) Lee SJ, Kim JS, Chung SW, Kim BS, Ahn KJ, Lee KS. White matter hyperintensities (WMH) are associated with intracranial atherosclerosis rather than extracranial atherosclerosis. *Arch Gerontol Geriatr* . 2011;53:e129-32.
- (84) 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, American Heart Association Stroke Council, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. 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.
- (85) Kappelle LJ, Eliasziw M, Fox AJ, Sharpe BL, Barnett HJ. Importance of intracranial atherosclerotic disease in patients with symptomatic stenosis of the internal carotid artery. The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Stroke* . 1999;30:282-286.
- (86) Lee SJ, Cho SJ, Moon HS, Shon YM, Lee KH, Kim DI, Lee BB, Byun HS, Han SH, Chung CS. Combined extracranial and intracranial atherosclerosis in Korean patients. *Arch Neurol* . 2003;60:1561-1564.
- (87) Hoshino A, Nakamura T, Enomoto S, Kawahito H, Kurata H, Nakahara Y, Ijichi T. Prevalence of coronary artery disease in Japanese patients with cerebral infarction: impact of metabolic syndrome and intracranial large artery atherosclerosis. *Circ J* . 2008;72:404-408.
- (88) Arenillas JF, Candell-Riera J, Romero-Farina G, Molina CA, Chacon P, Aguade-Bruix S, Montaner J, de Leon G, Castell-Conesa J, Alvarez-Sabin J. Silent myocardial ischemia in patients with symptomatic intracranial atherosclerosis: associated factors. *Stroke* . 2005;36:1201-1206.
- (89) Calvet D, Touze E, Varenne O, Sablayrolles JL, Weber S, Mas JL. Prevalence of asymptomatic coronary artery disease in ischemic stroke patients: the PRECORIS study. *Circulation* . 2010;121:1623-1629.

- (90) Busch MA, Lutz K, Rohl JE, Neuner B, Masuhr F. Low ankle-brachial index predicts cardiovascular risk after acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *Stroke* . 2009;40:3700-3705.
- (91) Ratanakorn D, Keandoungchun J, Tegeler CH. Coexistent Extra- and Intracranial Stenosis, Cervical Atherosclerosis, and Abnormal Ankle Brachial Index in Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* . 2011.
- (92) Caplan LR, Gorelick PB, Hier DB. Race, sex and occlusive cerebrovascular disease: a review. *Stroke* . 1986;17:648-655.
- (93) Resch JA, Okabe N, Loewenson RB, Kimoto K, Katsuki S, Baker AB. Pattern of vessel involvement in cerebral atherosclerosis. A comparative study between a Japanese and Minnesota population. *J Atheroscler Res* . 1969;9:239-250.
- (94) Leung SY, Ng TH, Yuen ST, Lauder IJ, Ho FC. Pattern of cerebral atherosclerosis in Hong Kong Chinese. Severity in intracranial and extracranial vessels. *Stroke* . 1993;24:779-786.
- (95) Mazighi M, Labreuche J, Gongora-Rivera F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Amarenco P. Autopsy prevalence of intracranial atherosclerosis in patients with fatal stroke. *Stroke* . 2008;39:1142-1147.
- (96) Huang YN, Gao S, Li SW, Huang Y, Li JF, Wong KS, Kay R. Vascular lesions in Chinese patients with transient ischemic attacks. *Neurology* . 1997;48:524-525.
- (97) White H, Boden-Albala B, Wang C, Elkind MS, Rundek T, Wright CB, Sacco RL. Ischemic stroke subtype incidence among whites, blacks, and Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Circulation* . 2005;111:1327-1331.
- (98) Rincon F, Sacco RL, Kranwinkel G, Xu Q, Paik MC, Boden-Albala B, Elkind MS. Incidence and risk factors of intracranial atherosclerotic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *Cerebrovasc Dis* . 2009;28:65-71.
- (99) Park JH, Kwon HM, Roh JK. Metabolic syndrome is more associated with intracranial atherosclerosis than extracranial atherosclerosis. *Eur J Neurol* . 2007;14:379-386.
- (100) Park HY, Kyeong-Ho, Park DS, Lee HS, Chang H, Kim YS, Cho KH. Correlation between insulin resistance and intracranial atherosclerosis in patients with ischemic stroke without diabetes. *J Stroke Cerebrovasc Dis* . 2008;17:401-405.
- (101) Bang OY, Saver JL, Liebeskind DS, Pineda S, Yun SW, Ovbiagele B. Impact of metabolic syndrome on distribution of cervicocephalic atherosclerosis: data from a diverse race-ethnic group. *J Neurol Sci* . 2009;284:40-45.
- (102) Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Kasner SE, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG, Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Trial Investigators. Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* . 2005;352:1305-1316.
- (103) Famakin BM, Chimowitz MI, Lynn MJ, Stern BJ, George MG, WASID Trial Investigators. Causes and severity of ischemic stroke in patients with symptomatic intracranial arterial stenosis. *Stroke* . 2009;40:1999-2003.
- (104) Kasner SE, Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG, Cloft HJ, Warfarin Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Trial Investigators. Predictors of ischemic stroke in the territory of a symptomatic intracranial arterial stenosis. *Circulation* . 2006;113:555-563.

- (105) Ovbiagele B, Cruz-Flores S, Lynn MJ, Chimowitz MI, Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID) Study Group. Early stroke risk after transient ischemic attack among individuals with symptomatic intracranial artery stenosis. *Arch Neurol* . 2008;65:733-737.
- (106) Williams JE, Chimowitz MI, Cotsonis GA, Lynn MJ, Waddy SP, WASID Investigators. Gender differences in outcomes among patients with symptomatic intracranial arterial stenosis. *Stroke* . 2007;38:2055-2062.
- (107) Waddy SP, Cotsonis G, Lynn MJ, Frankel MR, Chaturvedi S, Williams JE, Chimowitz M. Racial differences in vascular risk factors and outcomes of patients with intracranial atherosclerotic arterial stenosis. *Stroke* . 2009;40:719-725.
- (108) Ovbiagele B, Saver JL, Lynn MJ, Chimowitz M, WASID Study Group. Impact of metabolic syndrome on prognosis of symptomatic intracranial atherostenosis. *Neurology* . 2006;66:1344-1349.
- (109) Mazighi M, Tanasescu R, Ducrocq X, Vicaut E, Bracard S, Houdart E, Woimant F. Prospective study of symptomatic atherothrombotic intracranial stenoses: the GESICA study. *Neurology* . 2006;66:1187-1191.
- (110) Wong KS, Li H. Long-term mortality and recurrent stroke risk among Chinese stroke patients with predominant intracranial atherosclerosis. *Stroke* . 2003;34:2361-2366.
- (111) Meseguer E, Lavalley PC, Mazighi M, Labreuche J, Cabrejo L, Olivot JM, Abboud H, Slaoui T, Lapergue B, Guidoux C, Klein IF, Touboul PJ, Amarenco P. Yield of systematic transcranial Doppler in patients with transient ischemic attack. *Ann Neurol* . 2010;68:9-17.
- (112) Arenillas JF, Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Gonzalez-Sanchez MA, Alvarez-Sabin J. Progression and clinical recurrence of symptomatic middle cerebral artery stenosis: a long-term follow-up transcranial Doppler ultrasound study. *Stroke* . 2001;32:2898-2904.
- (113) Wong KS, Li H, Lam WW, Chan YL, Kay R. Progression of middle cerebral artery occlusive disease and its relationship with further vascular events after stroke. *Stroke* . 2002;33:532-536.
- (114) Akins PT, Pilgram TK, Cross DT, 3rd, Moran CJ. Natural history of stenosis from intracranial atherosclerosis by serial angiography. *Stroke* . 1998;29:433-438.
- (115) Miyazawa N, Akiyama I, Yamagata Z. Analysis of incidence and risk factors for progression in patients with intracranial steno-occlusive lesions by serial magnetic resonance angiography. *Clin Neurol Neurosurg* . 2007;109:680-685.
- (116) Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Chacon P, Montaner J, Rovira A, Ibarra B, Quintana M. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* . 2003;34:2463-2468.
- (117) Arenillas JF, Massot A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Chacon P, Quintana M, Molina CA, Rovira A, Montaner J. C-reactive protein gene C1444T polymorphism and risk of recurrent ischemic events in patients with symptomatic intracranial atherostenoses. *Cerebrovasc Dis* . 2009;28:95-102.

- (118) Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Chacon P, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Delgado P, Rubiera M, Penalba A, Rovira A, Montaner J. Progression of symptomatic intracranial large artery atherosclerosis is associated with a proinflammatory state and impaired fibrinolysis. *Stroke* . 2008;39:1456-1463.
- (119) Shimizu K, Shimomura K, Tokuyama Y, Sakurai K, Isahaya K, Takaishi S, Kato B, Usuki N, Shimizu T, Yamada K, Hasegawa Y. Association between Inflammatory Biomarkers and Progression of Intracranial Large Artery Stenosis after Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* . 2011.
- (120) Massot A, Pelegri D, Penalba A, Arenillas J, Boada C, Giralt D, Ribo M, Molina CA, Rosell A, Alvarez-Sabin J, Chacon P, Rovira A, Delgado P, Montaner J. Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* . 2011;218:181-187.
- (121) Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Vila-Caballer M, Fortuno A, Beloqui O, Zalba G, Burks D, Diez J, Andres V. Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2008;28:2187-2194.
- (122) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* . 1985;28:412-419.
- (123) Bang OY, Saver JL, Ovbiagele B, Choi YJ, Yoon SR, Lee KH. Adiponectin levels in patients with intracranial atherosclerosis. *Neurology* . 2007;68:1931-1937.
- (124) Park JH, Hong KS, Lee EJ, Lee J, Kim DE. High levels of apolipoprotein B/AI ratio are associated with intracranial atherosclerotic stenosis. *Stroke* . 2011;42:3040-3046.
- (125) Sirimarco G, Deplanque D, Lavallee PC, Labreuche J, Meseguer E, Cabrejo L, Guidoux C, Olivot JM, Abboud H, Lapergue B, Klein IF, Mazighi M, Touboul PJ, Bruckert E, Amarenco P. Atherogenic dyslipidemia in patients with transient ischemic attack. *Stroke* . 2011;42:2131-2137.
- (126) Chimowitz MI, Lynn MJ, Turan TN, Fiorella D, Lane BF, Janis S, Derdeyn CP, SAMMPRIS Investigators. Design of the stenting and aggressive medical management for preventing recurrent stroke in intracranial stenosis trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis* . 2011;20:357-368.
- (127) Chimowitz MI, Lynn MJ, Derdeyn CP, Turan TN, Fiorella D, Lane BF, Janis LS, Lutsep HL, Barnwell SL, Waters MF, Hoh BL, Hourihane JM, Levy EI, Alexandrov AV, Harrigan MR, Chiu D, Klucznik RP, Clark JM, McDougall CG, Johnson MD, Pride GL, Jr, Torbey MT, Zaidat OO, Rumboldt Z, Cloft HJ, SAMMPRIS Trial Investigators. Stenting versus aggressive medical therapy for intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* . 2011;365:993-1003.
- (128) Abou-Chebl A, Steinmetz H. Critique of "Stenting versus aggressive medical therapy for intracranial arterial stenosis" by Chimowitz et al in the new England Journal of Medicine. *Stroke* . 2012;43:616-620.
- (129) Marks MP. Is there a future for endovascular treatment of intracranial atherosclerotic disease after Stenting and Aggressive Medical Management for Preventing Recurrent Stroke and Intracranial Stenosis (SAMMPRIS)? *Stroke* . 2012;43:580-584.

- (130) Wong KS, Chen C, Fu J, Chang HM, Suwanwela NC, Huang YN, Han Z, Tan KS, Ratanakorn D, Chollate P, Zhao Y, Koh A, Hao Q, Markus HS, CLAIR study investigators. Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for reducing embolisation in patients with acute symptomatic cerebral or carotid artery stenosis (CLAIR study): a randomised, open-label, blinded-endpoint trial. *Lancet Neurol* . 2010;9:489-497.
- (131) Kwon SU, Hong KS, Kang DW, Park JM, Lee JH, Cho YJ, Yu KH, Koo JS, Wong KS, Lee SH, Lee KB, Kim DE, Jeong SW, Bae HJ, Lee BC, Han MK, Rha JH, Kim HY, Mok VC, Lee YS, Kim GM, Suwanwela NC, Yun SC, Nah HW, Kim JS. Efficacy and safety of combination antiplatelet therapies in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis. *Stroke* . 2011;42:2883-2890.
- (132) de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O'Leary DH, Rosvall M, Sitzer M, Buskens E, Bots ML. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke* . 2010;41:1294-1297.
- (133) Huang HW, Guo MH, Lin RJ, Chen YL, Luo Q, Zhang Y, Wong KS. Prevalence and risk factors of middle cerebral artery stenosis in asymptomatic residents in Rongqi County, Guangdong. *Cerebrovasc Dis* . 2007;24:111-115.
- (134) Wong KS, Ng PW, Tang A, Liu R, Yeung V, Tomlinson B. Prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis in high-risk patients. *Neurology* . 2007;68:2035-2038.
- (135) Thomas GN, Lin JW, Lam WW, Tomlinson B, Yeung V, Chan JC, Liu R, Wong KS. Increasing severity of cardiovascular risk factors with increasing middle cerebral artery stenotic involvement in type 2 diabetic Chinese patients with asymptomatic cerebrovascular disease. *Diabetes Care* . 2004;27:1121-1126.
- (136) Bae HJ, Lee J, Park JM, Kwon O, Koo JS, Kim BK, Pandey DK. Risk factors of intracranial cerebral atherosclerosis among asymptomatics. *Cerebrovasc Dis* . 2007;24:355-360.
- (137) Kang K, Lee K, Chung SH. The triglyceride:high-density lipoprotein-cholesterol ratio and steno-occlusive disease in the intracranial arteries. *J Thromb Thrombolysis* . 2011;32:103-109.
- (138) Uehara T, Tabuchi M, Mori E. Risk factors for occlusive lesions of intracranial arteries in stroke-free Japanese. *Eur J Neurol* . 2005;12:218-222.
- (139) Park KY, Chung CS, Lee KH, Kim GM, Kim YB, Oh K. Prevalence and risk factors of intracranial atherosclerosis in an asymptomatic Korean population. *J Clin Neurol* . 2006;2:29-33.
- (140) Elmore EM, Mosquera A, Weinberger J. The prevalence of asymptomatic intracranial large-vessel occlusive disease: the role of diabetes. *J Neuroimaging* . 2003;13:224-227.
- (141) Homburg PJ, Plas GJ, Rozie S, van der Lugt A, Dippel DW. Prevalence and calcification of intracranial arterial stenotic lesions as assessed with multidetector computed tomography angiography. *Stroke* . 2011;42:1244-1250.
- (142) Thomas GN, Chen XY, Lin JW, Tomlinson B, Lam WW, Liu R, Yeung VT, Chan JC, Wong KS. Middle cerebral artery stenosis increased the risk of vascular disease mortality among type 2 diabetic patients. *Cerebrovasc Dis* . 2008;25:261-267.

- (143) Ni J, Yao M, Gao S, Cui LY. Stroke risk and prognostic factors of asymptomatic middle cerebral artery atherosclerotic stenosis. *J Neurol Sci* . 2011;301:63-65.
- (144) Mok VC, Lam WW, Chen XY, Wong A, Ng PW, Tsoi TH, Yeung V, Liu R, Soo Y, Leung TW, Wong KS. Statins for asymptomatic middle cerebral artery stenosis: The Regression of Cerebral Artery Stenosis study. *Cerebrovasc Dis* . 2009;28:18-25.
- (145) Kremer C, Schaettin T, Georgiadis D, Baumgartner RW. Prognosis of asymptomatic stenosis of the middle cerebral artery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* . 2004;75:1300-1303.
- (146) Kern R, Steinke W, Daffertshofer M, Prager R, Hennerici M. Stroke recurrences in patients with symptomatic vs asymptomatic middle cerebral artery disease. *Neurology* . 2005;65:859-864.
- (147) Takahashi W, Ohnuki T, Ohnuki Y, Kawada S, Takagi S. The role of high-sensitivity C-reactive protein in asymptomatic intra- and extracranial large artery diseases. *Cerebrovasc Dis* . 2008;26:549-555.
- (148) Maas R, Xanthakis V, Polak JF, Schwedhelm E, Sullivan LM, Benndorf R, Schulze F, Vasan RS, Wolf PA, Boger RH, Seshadri S. Association of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA with carotid artery intimal media thickness in the Framingham Heart Study of spring cohort. *Stroke* . 2009;40:2715-2719.
- (149) Pikula A, Boger RH, Beiser AS, Maas R, DeCarli C, Schwedhelm E, Himali JJ, Schulze F, Au R, Kelly-Hayes M, Kase CS, Vasan RS, Wolf PA, Seshadri S. Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham of spring study. *Stroke* . 2009;40:2959-2964.
- (150) Boger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* . 2009;60:481-487.
- (151) Boger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, Wang TJ, Maas R, Benjamin EJ, Schulze F, Xanthakis V, Benndorf RA, Vasan RS. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation* . 2009;119:1592-1600.
- (152) Sydow K, Mondon CE, Schrader J, Konishi H, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2008;28:692-697.
- (153) Siervo M, Bluck LJ. In vivo nitric oxide synthesis, insulin sensitivity, and asymmetric dimethylarginine in obese subjects without and with metabolic syndrome. *Metabolism* . 2011.
- (154) Chen C, Jiang J, Lu JM, Chai H, Wang X, Lin PH, Yao Q. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2010;299:H193-201.
- (155) Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E, Durrani S, Dullum MK, Devaney JM, Fishman C, Stamou S, Canos D, Zbinden S, Clavijo LC, Jang GJ, Andrews JA, Zhu J, Epstein SE. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis* . 2005;182:241-248.
- (156) Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* . 2005;111:932-939.



- (157) Shin HJ, Park S, Yoon SJ, Choi DS, Cho DK, Kim JS, Ko YG, Choi D, Jang Y, Chung N. Association between serum resistin and carotid intima media thickness in hypertension patients. *Int J Cardiol* . 2008;125:79-84.
- (158) Choi HY, Kim S, Yang SJ, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. Association of adiponectin, resistin, and vascular inflammation: analysis with 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2011;31:944-949.
- (159) Efstathiou SP, Tsiakou AG, Tsioulos DI, Panagiotou TN, Pefanis AV, Achimastos AD, Mountokalakis TD. Prognostic significance of plasma resistin levels in patients with atherothrombotic ischemic stroke. *Clin Chim Acta* . 2007;378:78-85.
- (160) Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther* . 2010;28:e72-91.
- (161) Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL, Cates CU, Creager MA, Fowler SB, Friday G, Hertzberg VS, Mclf EB, Moore WS, Panagos PD, Riles TS, Rosenwasser RH, Taylor AJ. 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS Guideline on the Management of Patients With Extracranial Carotid and Vertebral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* . 2011.
- (162) Alzamora MT, Baena-Diez JM, Sorribes M, Fores R, Toran P, Vicheto M, Pera G, Reina MD, Albaladejo C, Llussa J, Bundo M, Sancho A, Heras A, Rubies J, Arenillas JF, PERART study. Peripheral Arterial Disease study (PERART): prevalence and predictive values of asymptomatic peripheral arterial occlusive disease related to cardiovascular morbidity and mortality. *BMC Public Health* . 2007;7:348.



**8**

# **ANEXOS**

# Manuscrito en Revisión

## DISTRIBUTION AND SEVERITY OF ASYMPTOMATIC EXTRA & INTRACRANIAL ATHEROSCLEROSIS: DIFFERENTIAL RISK FACTOR AND BIOMARKER PROFILES The Barcelona- AsIA (Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis) Study

López-Cancio, E (MD); Galán, A (MD PhD); Dorado, L (MD); Jiménez, M (MD); Hernández, M (MD);  
Millán, M (MD PhD); Reverté, S (RN); Suñol, A (RN); Barallat, J (MD); Massuet, A (MD);  
Alzamora, MT (MD PhD); Dávalos, A (MD PhD); Arenillas, JF (MD PhD)

**Background:** Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) remains a challenge for stroke primary and secondary prevention. Molecular pathways involved in the development of ICAD from its asymptomatic stages are largely unknown. In our population-based study, we aimed to compare the risk factor and biomarker profiles of intracranial vs. extracranial asymptomatic cerebral atherosclerosis.

**Methods and results:** AsIA study cohort includes a random sample population of 933 Caucasian subjects older than 50, with a moderate-high vascular risk and without history of stroke (64% males, mean age 66 years). Carotid and intracranial atherosclerosis were screened by cervical and transcranial color-coded Duplex ultrasound, being moderate-severe stenoses confirmed by MR angiography. We registered clinical and anthropometric data and created a biobank with blood samples at baseline. A panel of biomarkers known to be representative of key molecular pathways involved in atherothrombogenesis was determined: C-reactive protein (CRP), asymmetric dimethylarginine (ADMA), resistin and plasminogen activator inhibitor (PAI-1). Insulin resistance was quantified by HOMA-IR index. After multinomial regression analyses, male sex, hypertension, smoking and alcoholic habits were independent risk factors of isolated extracranial atherosclerotic disease (ECAD). Diabetes and metabolic syndrome were stronger independent risk factors of ICAD. Moreover, metabolic syndrome and insulin resistance were independent risk factors of moderate-severe ICAD but were not risk factors of moderate-severe ECAD. Regarding biomarkers, ADMA was independently associated with isolated ICAD and resistin with combined ICAD-ECAD.

**Conclusions:** Our findings show distinct clinical and biological signatures of subclinical ICAD vs. ECAD. Insulin resistance emerged as a crucial molecular pathway involved in the development of ICAD from its asymptomatic stage.

**Key word list:** cerebral atherosclerosis ■ risk factors ■ insulin ■ inflammation ■ prevention

Atherosclerosis is a multifactorial, progressive and systemic disease considered the most important cause of morbidity and mortality in developing countries. Atherosclerosis usually attacks multiple arteries throughout the body, including the aorta, coronary arteries, limbs and arteries supplying the brain. Although similar well-known vascular risk factors and molecular pathways are involved in the global process of atherogenesis, local expression and severity of atherosclerosis differs among vulnerable individuals. A paradigm of this disparity is the different ethnical-race cervicocephalic distribution of large artery cerebral atherosclerosis. Whereas intracranial arteries are much more frequently affected in Asians, African-Americans

and Hispanics, extracranial carotid atherosclerosis is more prevalent among Caucasians<sup>1-4</sup>. The origin of these differences is not explained alone by a different prevalence of conventional vascular risk factors among races, then supporting the hypothesis that other underlying environmental, molecular and genetic factors must play determinant roles in the distinct cerebral atherogenic process. Besides this, differences in hemodynamic, histological and anatomic characteristics between extra and intracranial arteries could lead to diverse responses to the same deleterious stimuli in the same race-ethnic group.

Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) remains a challenge for stroke secondary prevention since even

with aggressive medical treatment, stroke recurrence is high<sup>5</sup>. Therefore, the study of risk factors and molecular pathways involved in this disease from its asymptomatic stage is essential to improve preventive strategies and to find new therapeutic targets. Some risk factors, as diabetes, insulin resistance and metabolic syndrome, have been lately reported to be more strongly associated with intracranial than with extracranial atherothrombotic ischemic stroke 6-9. Moreover, few retrospective studies have evaluated inflammatory markers associated to the different location and severity of cerebral atherosclerosis 10-13. However, studies in asymptomatic stages of cerebral atherosclerosis, when atherosclerotic lesions are not yet complicated by thrombosis or plaque rupture, are lacking.

The main objective of the present study is to investigate whether there is a differential profile of vascular risk factors and relevant biomarkers between asymptomatic intracranial atherosclerosis and cervical large artery atherosclerosis in a randomly recruited stroke-free Caucasian population. Novel vascular risk factors assessed included direct measures of insulin resistance. Several predefined biomarkers, considered to be representative of key molecular pathways involved in atherogenesis, were determined.

### Methods

Barcelona-AsIA study (Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis study) is an ongoing population-based, cross-sectional and longitudinal study that includes a random sample of 933 subjects older than 50 years, with a moderate-high vascular risk and without previous history of neither stroke nor coronary disease. Complete study protocol and first results on intracranial atherosclerosis prevalence have been reported in detail elsewhere<sup>14,15</sup>. This study is approved by the Ethics Committee of our institution.

Briefly, all subjects were visited at the clinic of our public tertiary stroke center, the Germans Trias i Pujol Hospital (Badalona, Barcelona, Spain). At baseline visit and after signing written informed consent, a complete questionnaire on sociodemographic and clinical data was obtained, anthropometric variables were measured (blood pressure, weight, height, waist circumference) and fasting blood samples were drawn

processed and stored in a biobank at -80°C. All subjects underwent a complete color-coded-duplex ultrasound study of the cervical and intracranial vessels to determine the presence of atherosclerotic lesions. Significant stenoses of the intra and extracranial vessels were confirmed by MR angiography (MRA).

### Traditional vascular risk factors

Vascular risk was calculated using the REGICOR score. REGICOR is the Framingham function adapted and validated for Spanish population and evaluates the 10-year risk (%) of having cardiovascular events based on a compute of traditional risk factors (sex, age, diabetes, smoking, blood pressure and cholesterol levels). REGICOR <5% indicates low risk, 5-9% moderate risk, 10-14% high risk and ≥ 15% very high risk.<sup>16</sup>

Hypertension, diabetes and dyslipemia were defined based on personal history of these diagnoses and on current diet or medical treatment intake for these disorders. Cholesterol, triglycerides and fasting glucose determined in baseline samples were also evaluated separately as continuous variables. Smoking habit was considered to be present in current smokers or if the time interval since abstinence was < 5 years. Alcohol consumption was considered moderate-severe if superior to 20 gr/day.

### Novel metabolic vascular risk factors

Metabolic syndrome was defined following the unified criteria of the last joint interim statement<sup>17</sup>, when three or more of the following were present: abdominal obesity for European population (>94 cm in men, and >80 cm in women), arterial blood pressure ≥130/≥85 mmHg in baseline visit or specific medication, level of triglycerides ≥150 mg/dl or specific medication, low HDL cholesterol (in men <40 mg/dl, and in women <50 mg/dl) or specific medication, and fasting plasma glucose ≥100 mg/dl or history of diabetes mellitus or taking antidiabetic medications.

Insulin resistance (IR) was evaluated using the homeostatic model assessment technique index (HOMA-IR), following the formula described by Matthews et al<sup>18</sup>:  $HOMA-IR = \text{glucose mg/dl} \times \text{insulin mUI/ml} / 405$ . Insulin resistance was considered when  $HOMA-IR \geq 3.2$ , based on the previously published 75<sup>th</sup> percentile of a general nondiabetic Spanish population<sup>19</sup>.

We also evaluated triglyceride/HDL ratio (TG/HDL), also related to insulin resistance.

### Biomarkers

AsIA study design included the analyses of the following prespecified circulating biomarkers involved in the atherothrombotic process: high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) as a classical inflammatory marker for atherosclerosis; Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) as a marker of endothelial dysfunction, acting as an endogenous inhibitor of endothelial Nitric Oxide (NO) synthase, not previously studied in intracranial atherosclerosis; Resistin as a marker for atherosclerosis and a novel link of metabolic signals, inflammation and atherosclerosis, and not previously studied in intracranial atherosclerosis either; and finally plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) as a marker of impaired endogenous fibrinolysis and also related to insulin resistance.

All blood samples were drawn at baseline visit after overnight fast of at least 12 hours. After centrifugation at 3500 rpm and 4°C for 15 minutes, serum or plasma was blind coded and stored at -80°C until analyzed. CRP measurement was carried out with a nephelometric method (Delta, Radim Iberica). PAI-1 levels were measured in citrated plasma using a sensitivity ELISA method (TECHNOZYM® PAI-1 Actibind, Technoclone GmbH, Vienna, Austria). Serum resistin concentrations were determined using a ELISA method (BioVendor, Czech Republic). ADMA was measured in serum with a competitive ADMA-ELISA from DLD Diagnostika (ref. EA201/96). All

previous ELISA analyses were performed in replicate in an automatic open system (Brio 2, Radim SpA pomezia, Rome, Italy). Mean coefficients of variation (CV) were <8% in all replicated samples. Insulin was measured using an ELISA handily determination (Radim ref KP101W), with a CV inter-assay lower than 6%.

### Evaluation of extracranial and intracranial atherosclerosis

All cervical and transcranial color-coded duplex (TCCD) ultrasound studies were performed at baseline in the same lab by two experienced neurologists using a General Electric Vivid/Pro equipment (Horten, Norway). Intravenous echo-contrast agents were used in subjects with insufficient transcranial acoustic window. Details about our ultrasound protocol have been previously published<sup>14</sup>. Carotid atherosclerotic plaques were defined in B-mode as the presence of any focal structure encroaching into the arterial lumen of at least 0.5 mm and/or a thickness > 1.5 mm of the intima-media interface in the common carotid artery, bifurcation, internal or external carotid arteries. Significant internal carotid stenosis  $\geq 50\%$  was defined if systolic peak velocity was higher than 125 cm/s. Intracranial stenoses were defined based on previously published criteria<sup>20</sup>. Intracranial stenosis severity by TCCD was classified following cut-off values of systolic peak velocity for mild/moderate-severe stenosis:  $\geq 155/\geq 220$  cm/s for middle cerebral artery;  $\geq 120/\geq 155$  cm/s for anterior cerebral artery;  $\geq 100/\geq 145$  cm/s for posterior cerebral and basilar arteries and  $\geq 90/\geq 120$  cm/s for vertebral artery. Subjects with a significant extracranial carotid stenosis ( $\geq 50\%$ ) and/or a moderate-severe intracranial stenosis in the baseline neurosonologic study underwent a confirmatory MRA study with a 1.5 T equipment (Philips). Intracranial stenoses were assessed with a time-of-flight (TOF) sequence and carotid stenoses with a contrast enhanced angiography and MIP reconstruction sequence.

### Subject grouping

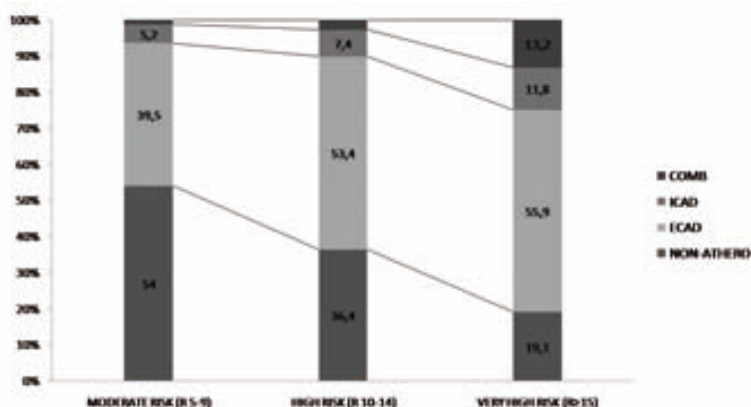
According to location of atherosclerotic lesions, subjects were categorized in four groups: (1) Non-atherosclerotic

group, if neither carotid plaques nor intracranial stenoses were found in the baseline ultrasound examination. This group served as the reference group for all further analyses; (2) Extracranial atherosclerosis disease (ECAD) group, if one or more carotid plaques were present in carotid arteries, regardless of stenosis degree, and with no concurrent intracranial arterial stenosis; (3) Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) group, if at least one intracranial stenosis of any degree was present, and without carotid atherosclerotic lesions; (4) Combined extracranial and intracranial group (COMB group), if intracranial cerebral arteries and extracranial carotid arteries were affected simultaneously.

According to the severity of lesions, subjects were classified into moderate-severe ECAD if at least one carotid stenosis  $\geq 50\%$  or occlusion was present and into moderate-severe ICAD if at least one moderate-severe intracranial stenosis was present. Subjects with moderate-severe lesions in both extra and intracranial vasculatures were not considered for this classification due to low numbers.

### Statistical Analysis

Statistics were performed with the SPSS 15.0 statistical package. The association of vascular risk factors and circulating biomarkers with each location of atherosclerosis was analyzed by Pearson's  $\chi^2$  test for categorical variables and Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test, Student-t test or ANOVA test for continuous variables. Different multinomial logistic regression models were performed to identify vascular risk factors and biomarkers independently associated with each location of atherosclerosis and with their severity, taking the non-atherosclerosis group as the reference for all analyses. For traditional vascular risk factors, we included in the model all those factors significantly associated with any location in the bivariate analyses ( $p < 0.05$ ). For metabolic syndrome, we performed a model adjusted for age, sex and REGICOR score. Insulin resistance was evaluated in two models, one adjusted for REGICOR score and the other adjusted for the rest of components of metabolic syndrome. Regarding circulating biomarkers, we analyzed them as continuous variables



**Figure 1: Prevalence of asymptomatic atherosclerosis (%) according to vascular risk score REGICOR (R).** Bars represent the percentage of atherosclerosis in each location. Non-Athero: subjects without atherosclerosis. ECAD: subjects with extracranial atherosclerotic disease. ICAD: subjects with intracranial atherosclerotic disease. COMB: subjects with combined extra and intracranial atherosclerotic disease.

Table 1. Baseline characteristics according to location and severity of atherosclerosis

Baseline characteristics	Control n=448	LOCATION			SEVERITY	
		ECAD group n=404	ICAD group n=57	COMB group n=23	ECAD mod-sev N=25	ICAD mod-sev N=27
REGICOR score	6 (5-8)	7 (6-11)**	9 (6.5-11)**	11 (7-17)**	10 (7-16)**	9 (7-11)**
Age	64.1±7.7	67.9±7.9**	69±8.6**	71.9±7.5**	72.8 (±7.4)**	69.6 (±10)**
Sex (%male)	56	72.5**	54.4	82.6*	84**	59.3
Smoking habit (%)	21.4	28.2*	17.5	21.7	36	14.8
Alcohol abuse (%)	8.5	16.6**	8.8	8.7	4	14.8
Hypertension (%)	47.5	62.3**	70.2**	91.3**	72*	77.8**
Diabetes (%)	18.8	30.2**	50.9**	65.2**	44**	63**
Dyslipidemia (%)	50.4	56.7	64.9*	69.6	52	66.7
Metabolic Syndrome (%)	61.8	73.1**	82.5**	95.7**	64	88.9**
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.7 (±4.3)	28.7 (±4.4)	28.1 (±3.5)	29.2 (±4.5)	28.8 (±5.3)	28.1 (±3.1)
HOMA-IR>3.2 (%)	54.3	65**	66.7*	69.6	56	81.5**
TG/HDL ratio	2.48 (±1.47)	2.51 (±1.49)	2.41 (±1.41)	2.98 (±2.41)	2.2 (±1)	3.1 (±2.25)*
Fasting glycemia (mg/dl)	107.2 (±24.7)	119.4 (±36.1)**	126.2 (±45.5)**	128.8 (±45.5)**	109.7 (±29.1)	131.1 (±51.6)**
Total cholesterol (mg/dl)	206.7 (±39.6)	204.2 (±40.6)	211.3 (±42)	188.7 (±42.8)*	201.2 (±32.4)	211.9 (±45.6)
LDL-cholesterol (mg/dl)	132.9 (±34.3)	129 (±35.6)	133.74 (±36.3)	116.4 (±37)*	129.3 (±29.9)	131.7 (±40.7)
HDL-cholesterol (mg/dl)	53.6 (±11.1)	54.6 (±11.9)	56.8(±12.9)	50.3 (±11.8)	53.9 (±10.9)	55.1 (±12.5)
Triglycerides (mg/dl)	125.6 (±63.8)	128.9 (±66.2)	129.6 (±69.5)	137.5 (±94.6)	112.6 (±44.1)	157.2 (±97.5)**
PCR (mg/dl)	4.1 (±0.26)	5.64 (±0.65)*	4.07 (±0.53)	6.78 (±2.5)*	6.4 (±1.82)	4.38 (±0.87)
Resistin (mg/dl)	4.35 (±0.08)	4.57 (±0.11)	5.09 (±0.59)*	6.53 (±1.83)**	5.23 (±0.47)*	4.57 (±0.38)
ADMA (mg/dl)	0.71 (±0.01)	0.73 (±0.01)	0.80 (±0.04)*	0.67 (±0.07)	0.63 (±0.04)	0.73 (±0.04)
PAI-1 (mg/dl)	6.08 (±0.43)	6.64 (±0.82)	6.34 (±1.35)	6.65 (±1.41)	5.5 (±2.11)	9.81 (±2.40)*

Control: non-atherosclerosis group. ECAD: extracranial atherosclerotic disease; ICAD: intracranial atherosclerotic disease; COMB: combined extra and intracranial atherosclerotic disease. Mod-sev: moderate-severe lesions. TG/HDL ratio: triglyceride/HDL ratio. Values are provided as median (IQR), mean±SD, mean±SE (circulating biomarkers) or percentages when (%) is indicated in the first column. Each group was compared to the reference group (control) using Chi2, t-student or U-Mann Whitney tests. \* p<0.05; \*\*p < 0.01

due to the small size of some groups that did not allow reliable analyses by quartiles. Circulating biomarkers were included in three different models in order to study their independent association with location and severity of atherosclerosis: model 1, adjusted for REGICOR score; model 2, adjusted for age, sex and metabolic syndrome; model 3, adjusted by individual risk factors significantly associated in bivariate analyses. Statistical significance was defined as a p value < 0.05. Results were expressed as odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

## Results

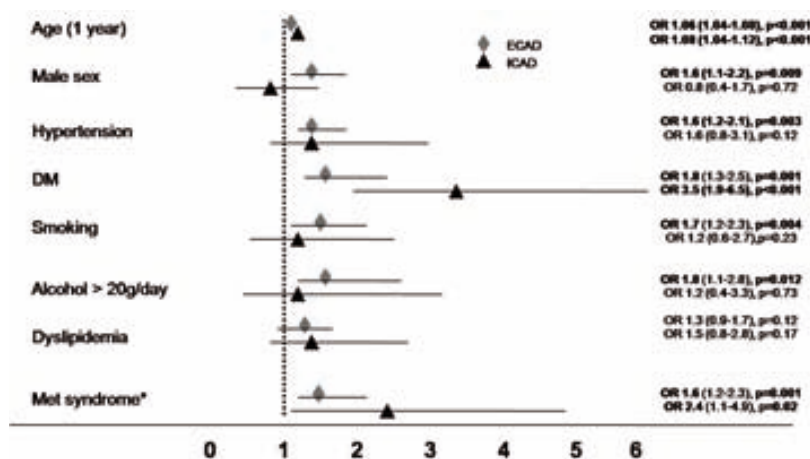
Of the 933 subjects included at baseline (64.2% men, mean age 66 years, 99% of Caucasian origin), 449 (48.2%) were classified in the non-atherosclerosis group (reference group), 404 (43%) in ECAD group, 57 (6.1%) in the ICAD group and 23 (2.5%) in the combined extra-intracranial group (COMB). Regarding stenosis severity, 29 subjects (3.1%) had a significant carotid stenosis (≥50%) and 31 subjects (3.3%) had at least one moderate-severe intracranial stenosis; 4 patients had both extra and intracranial moderate-severe lesions and were excluded for the analyses on stenosis severity. Baseline

characteristics according to the location and severity of atherosclerosis and comparisons with the non-atherosclerotic group are shown in table 1.

## Traditional vascular risk factors and location/severity of atherosclerosis

REGICOR score was progressively higher among the non-atherosclerosis, ECAD, ICAD and COMB groups p<0.001 (table 1). Prevalence of atherosclerosis in each location according to REGICOR score classification in moderate, high and very-high vascular risk subjects is represented in figure 1.

We performed a multinomial regression analysis to compare the strength of the associations of vascular risk factors with the different location of the cerebral atherosclerotic disease. Male gender, smoking habit, alcohol abuse and hypertension were independent predictors for isolated ECAD but not for ICAD. Age and diabetes were independent risk factors of both locations, but diabetes conferred a higher risk for the intracranial location (figure 2). Independent risk factors for combined ECAD-ICAD were age, male sex, diabetes and hypertension (data not shown in figure 2).



**Figure 2: Multinomial regression analysis: independent risk factors of ECAD and ICAD.** ECAD: extracranial atherosclerotic disease; ICAD: intracranial atherosclerotic disease. The model was built including all factors significantly associated ( $p < 0.05$ ) with any location in the bivariate analysis. \*Metabolic syndrome was analyzed in a different model adjusted by age, sex and REGICOR score. The non-atherosclerosis group was used as the reference. Horizontal bars represent 95% CI.

**Table 2. Multinomial regression analysis: independent risk factors of moderate-severe ECAD and ICAD**

	Moderate-severe ECAD	Moderate-severe ICAD
Age (1 year)	<b>1.13 (1.07-1.19)</b> <b>p&lt;0.001</b>	<b>1.08 (1.02-1.14)</b> <b>p=0.005</b>
Male gender	<b>4.17 (1.31-13.3)</b> <b>p=0.01</b>	1.45 (0.61-3.45) p=0.39
Hypertension	1.98 (0.76-5.16) p=0.16	2.29 (0.86-6.07) p=0.09
Diabetes	<b>3.76 (1.5-9.4)</b> <b>p=0.005</b>	<b>6.65 (2.8-15.78)</b> <b>p&lt;0.001</b>
Metabolic syndrome*	1.04 (0.4-2.66) p=0.93	<b>4.24(1.22-14.76)</b> <b>p=0.023</b>

ECAD: extracranial atherosclerotic disease; ICAD: intracranial atherosclerotic disease. The model was built including all factors significantly associated ( $p < 0.05$ ) with any severity group in the bivariate analysis. \*Metabolic syndrome was analyzed in a different model adjusted by age, sex and REGICOR score. The non-atherosclerosis group was used as the reference. OR represented as OR (95% CI).

Regarding severity of atherosclerosis, subjects with moderate-severe atherosclerotic lesions were significantly older, had a higher vascular risk score assessed by REGICOR, and were more frequently hypertensive and diabetic both in the moderate-severe ECAD and moderate-severe ICAD groups, when compared to controls (table 1). In the multinomial regression analysis for severity groups (table 2), age and diabetes were independent risk factors for the presence of moderate-severe lesions in both ECAD and ICAD groups. Once more, diabetes was a stronger risk factor of moderate-severe ICA location (OR 6.65 for moderate-severe ICAD and OR 3.76 for moderate-severe ECAD). Differentially, male gender was an independent risk factor only for moderate-severe-ECAD.

**Novel metabolic risk factors and location/severity of atherosclerosis**

Metabolic syndrome was more prevalent in atherosclerosis groups than in controls (table 1). After multinomial

regression analysis adjusted for age, sex and REGICOR, metabolic syndrome was an independent risk factor of both locations of atherosclerosis, but with a higher odds ratio for intracranial location (figure 2). Regarding severity, metabolic syndrome was significantly associated with moderate-severe-ICAD and was not with moderate-severe-ECAD. Moreover prevalence of moderate-severe ICAD was progressively higher with increasing number of metabolic syndrome criteria, while prevalence of moderate-severe ECAD was similar among these groups (figure 3). Metabolic syndrome emerged as an important predictor for moderate-severe-ICAD (OR 4.24, 95% CI [1.22-14.76]  $p=0.01$ ) after multinomial regression analysis (table 2).

Insulin resistance (HOMA-IR  $\geq 3.2$ ) was also more prevalent in all atherosclerotic groups, especially in moderate-severe ICAD (table 1). Prevalence of moderate-severe ICAD was progressively higher with HOMA-

**Table 3. Multinomial regression analysis: insulin resistance measured by HOMA-IR and severity of atherosclerotic lesions in ECAD and ICAD groups**

	Moderate-severe ECA	Moderate-severe ICA
Model 1	0.85 (0.36-2.03) p=0.72	<b>3.45 (1.26-9.48)</b> <b>p= 0.01</b>
Model 2	1.24 (0.52-2.96) p=0.63	<b>2.91 (1.05-8.08)</b> <b>p= 0.04</b>

ECAD: extracranial atherosclerotic disease; ICAD: intracranial atherosclerotic disease. OR and (95% CI) with non-atherosclerosis group taken as the reference. Model 1: adjusted for REGICOR score, age and sex; Model 2: adjusted for rest of components of metabolic syndrome: waist circumference, blood pressure, triglycerides and low-HDL components.

IR quartiles, while prevalence of moderate-severe ECAD was similar among these groups (figure 4). In multivariate analysis adjusted for age, gender and REGICOR score, insulin resistance was an independent predictor for moderate-severe ICAD and was not a predictor for moderate-severe ECAD. When adjusted for the rest of components of the metabolic syndrome, insulin resis-

**Table 4. Multinomial regression models of circulating biomarkers for location of the cerebral atherosclerotic disease.**

	ECAD	ICAD	COMBINED
<b>CRP mg/dl</b>			
Model 1	1.02 (0.99-1.04) p=0.07	0.99 (0.94-1.04) p=0.78	1.03 (0.99-1.07) p=0.14
Model 2	<b>1.02 (1.00-1.04)</b> <b>p=0.04</b>	1 (0.95-1.05) p=0.98	1.03 (0.99-1.07) p=0.09
Model 3	1.02 (0.99-1.04) p=0.06	0.99 (0.94-1.05) p=0.86	1.03 (0.99-1.06) p=0.15
<b>Resistin mg/dl</b>			
Model 1	1.03(0.96-1.1) p=0.33	1.09 (0.99-1.18) p=0.06	<b>1.14 (1.03-1.24)</b> <b>p&lt;0.01</b>
Model 2	1.03(0.96-1.1) p=0.43	1.08 (0.98-1.19) p=0.12	<b>1.11 (1.01-1.22)</b> <b>p=0.03</b>
Model 3	1.02(0.95-1.09) p=0.62	1.06 (0.97-1.17) p=0.19	<b>1.1 (1.01-1.20)</b> <b>p=0.04</b>
<b>ADMA mg/dl</b>			
Model 1	1.43 (0.88-2.31) p=0.14	<b>2.8 (1.24-6.52)</b> <b>p=0.01</b>	0.59 (0.08-4.14) p=0.60
Model 2	1.55 (0.94-2.55) p=0.08	<b>2.72 (1.17-6.34)</b> <b>p=0.02</b>	0.58 (0.09-3.69) p=0.56
Model 3	1.54 (0.93-2.53) p=0.09	<b>2.91 (1.21-6.27)</b> <b>p=0.02</b>	0.48 (0.07-3.35) p=0.46

ECAD: extracranial atherosclerotic disease; ICAD: intracranial atherosclerotic disease; Combined: extracranial and intracranial atherosclerotic disease. OR and (95% CI) with non-atherosclerosis group taken as the reference. Model 1: adjusted for REGICOR score; Model 2: adjusted for metabolic syndrome, age and sex; Model 3: adjusted for individual vascular risk factors age, sex, smoking habit, alcohol consumption, hypertension and diabetes.

tance kept independently associated with moderate-severe ICA (table 3).

TG/HDL ratio was significantly associated with moderate-severe ICAD (table 1), but did not resist multivariate analysis.

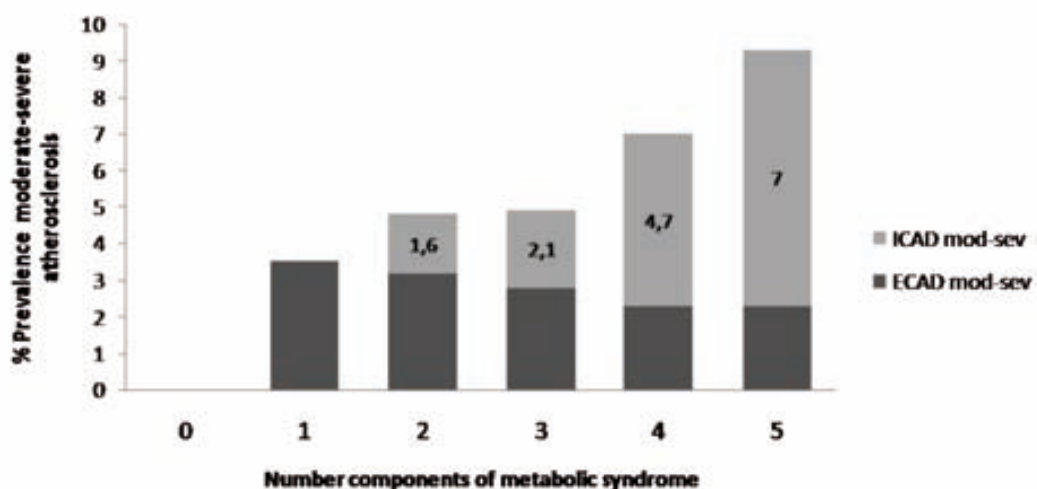
### Circulating biomarkers and location/severity of atherosclerosis

Regarding location groups, CRP was significantly associated with isolated ECAD and with combined ECAD-ICAD, high resistin levels were significantly associated with ICAD and with combined ECAD-ICAD, and high ADMA levels were significantly associated with isolated ICAD (table 1 and figure 5A). In multivariable analyses, resistin kept independently associated with combined extra-intra atherosclerotic disease and ADMA kept independently associated with isolated ICAD (Table 4). PCR was independently associated with ECAD location in model 2 (adjusted for age, gender and metabolic syndrome).

Regarding severity of atherosclerosis, high PAI-1 levels were significantly associated with moderate-severe ICAD and high resistin levels were significantly associated with moderate-severe ECAD (table 1 and fig 5B), but these associations did not resist multivariate analyses. There were no differences in ADMA or CRP levels between moderate-severe atherosclerosis groups and the control group.

### Discussion

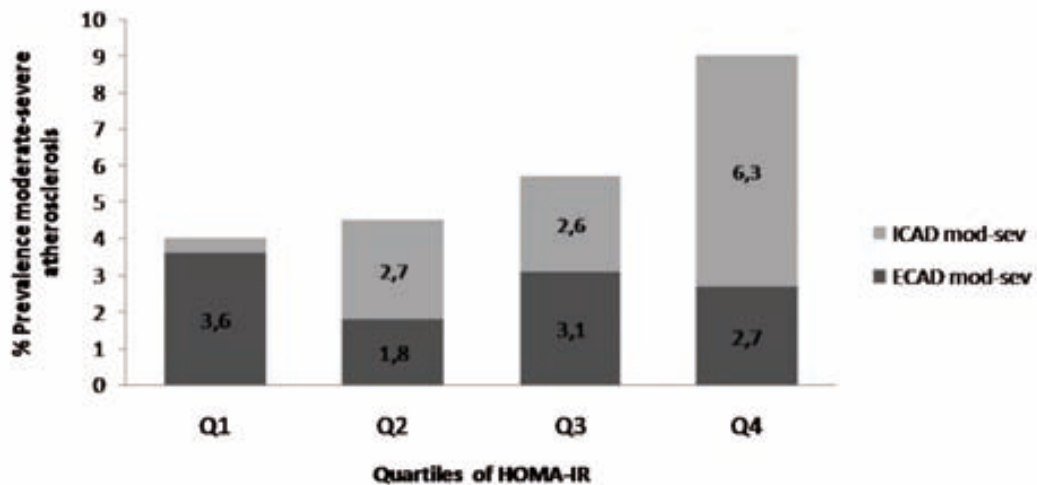
In our stroke-free Caucasian population, different traditional vascular risk factors are independently associated with the distinct cervicocephalic location and severity of asymptomatic atherosclerosis. Male gender, smoking habit and alcohol abuse were independent predictors of isolated extracranial carotid atherosclerosis, being male gender independently associated with moderate-severe carotid stenoses. Age and diabetes were independent risk factors of atherosclerosis in both locations, but diabetes conferred a substantially higher risk for intracranial loca-



**Figure 3: Prevalence of moderate-severe ECAD and moderate-severe ICAD (%) according to number of criteria of Metabolic Syndrome.**

Numbers in x-axis represent number of criteria of metabolic syndrome. Each bar represents the prevalence (percentage within bars) of moderate-severe extracranial (ECAD) and intracranial (ICAD) atherosclerotic disease in the whole population.



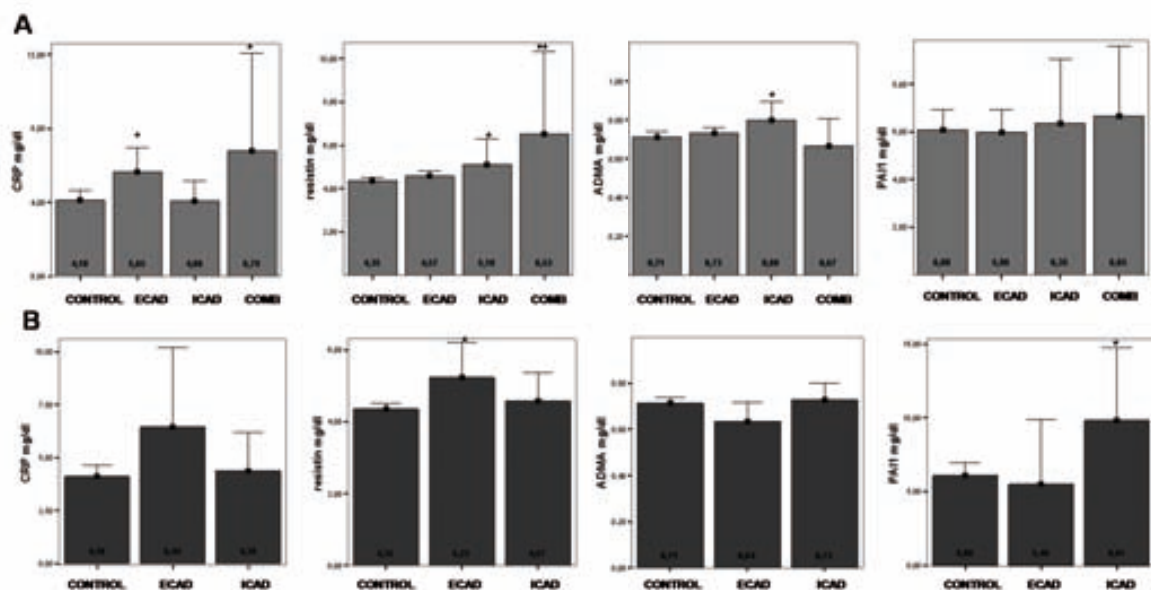


**Figure 4: Prevalence of moderate-severe ECAD and moderate-severe ICAD (%) according to HOMA-IR quartiles.** Quartiles represented in x-axis. Each bar represents the prevalence (percentage within bars) of moderate-severe extracranial (ECAD) and intracranial (ICAD) atherosclerotic disease in the whole population.

tion of atherosclerosis and especially for the presence of moderate-severe intracranial atherosclerotic lesions.

Metabolic syndrome has received increased attention in the past few years as it seems to promote the development of atherosclerotic cardiovascular disease. In our population, metabolic syndrome was independently associated with both ECAD and ICAD, being stronger this association with intracranial location, and especially with moderate-severe lesions. Metabolic syndrome has been previously reported as a specific risk factor for intracranial atherosclerosis in stroke populations of different racial backgrounds<sup>9,21-23</sup>, and the present study confirms this particular association in asymptomatic Caucasian subjects. The reasons that explain

the different effect of vascular risk factors in the cervicocephalic distribution of atherosclerotic lesions are not well understood. In a recent study comparing stroke mechanisms, authors conclude that the impact of metabolic syndrome may differ by race-ethnicity, reporting that metabolic syndrome was associated with ECAD in whites and with ICAD in non-whites (Hispanics, Asian-Americans and African-Americans)<sup>24</sup>. However, we found that metabolic syndrome is a stronger independent risk factor of ICAD in our white population, supporting the hypothesis that other underlying factors have to determine this specific association in all ethnicities. Metabolic syndrome confers a pro-inflammatory and hypercoagulable state mainly mediated by insulin



**Figure 5: Circulating biomarkers according to location and severity of cerebral atherosclerosis.** Circulating biomarkers related to any degree of atherosclerosis (panel A) and to moderate-severe lesions (panel B). Control: non-atherosclerosis group. ECAD: extracranial atherosclerotic disease. ICAD: intracranial atherosclerotic disease. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control group (non atherosclerosis group). Bars show 95% CI of the mean.

resistance. Accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome has been related to defective insulin signaling pathways in humans and animal models<sup>25</sup>. In the present study, insulin resistance measured by HOMA index was an independent marker of moderate-severe ICA even after adjusting for the rest of components of metabolic syndrome. These findings support the idea that intracranial arteries are especially prone to suffer the effects of insulin resistance and impaired insulin signaling. In a previous autopsy study, authors showed that in younger ages, intracranial arteries contain a higher activity of antioxidant enzymes compared to extracranial arteries

protecting them from atherosclerosis. This antioxidant activity decreases with age, coinciding with a rapid acceleration of atherosclerosis in intracranial arteries<sup>26</sup>. In this line and supported by our findings, intracranial arteries seem to be more sensitive to the oxidative stress conferred by insulin resistance and related metabolic and molecular alterations, even from the early subclinical stages of atherosclerosis. This hypothesis needs to be confirmed by further basic research.

Circulating biomarkers may represent a powerful tool to assess the pathophysiology of atherosclerosis in vivo. We found that CRP levels were significantly higher in subjects with ECAD than in those with ICAD, similar to previously reported<sup>10,12</sup>. Resistin is a protein secreted by adipocytes and related to insulin resistance in rodents, while in humans is mainly secreted by inflammatory cells and has been reported as a marker of coronary and carotid atherosclerosis<sup>27,28</sup>. In the present study, resistin was independently associated with atherosclerotic burden, especially with combined ECAD and ICAD. As in previous studies in humans, resistin was not associated with metabolic syndrome or insulin resistance in our sample. High levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of endothelial Nitric Oxide (NO) synthase and marker of endothelial dysfunction, were independently associated with isolated ICAD, but were not with moderate-severe ICAD or with combined ECAD and ICAD. ADMA has previously been associated with carotid intima-media thickness (IMT) but in a site-specific manner, being independently associated with IMT in the carotid bulb but not in the common carotid artery<sup>29</sup>. In the present study, higher circulating levels of ADMA may indicate an important role of endothelial dysfunction in early stages of intracranial atherosclerosis.

Strengths of this study include the large random population-based sample, the determination of molecules blinded to atherosclerosis data and determination of molecules not previously studied in asymptomatic intracranial atherosclerosis. Limitations include the cross-sectional design that does not allow us to establish causal inferences.

In conclusion, asymptomatic ICAD and ECAD seem to be characterized by a differential risk factor and molecular profile in our Caucasian population, thus suggesting a distinct vulnerability of intracranial and ex-

tracranial arteries to be affected by atherosclerosis. Our findings support a preeminent role of insulin resistance and related metabolic abnormalities in the development of ICAD from its early stages. This observation may have practical implications for the design of specific prevention strategies in ICAD and for the research with new therapies targeting insulin sensitivity. This study also warrants further study on genetic background explaining the differential profile in cerebral atherosclerosis.

### Funding sources

This project is supported by the program of Promotion in the Biomedical Investigation and Health Sciences from the Carlos III Health Institute of the Spanish Health and Social Policy Ministry (PI070393). Dr. López-Cancio is Granted with a Río Hortega Research Fellowship, co-financed by Carlos III Health Institute and the Health Sciences Research Institute of the Germans Trias i Pujol Foundation (IGTP).

### Disclosures

None

### References

1. Wityk RJ, Lehman D, Klag M, Coresh J, Ahn H, Litt B. Race and sex differences in the distribution of cerebral atherosclerosis. *Stroke* . 1996;27:1974-1980.
2. Sacco RL, Kargman DE, Gu Q, Zamanillo MC. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* . 1995;26:14-20.
3. Wong KS, Huang YN, Gao S, Lam WW, Chan YL, Kay R. Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology* . 1998;50:812-813.
4. De Silva DA, Woon FP, Lee MP, Chen CP, Chang HM, Wong MC. South Asian patients with ischemic stroke: intracranial large arteries are the predominant site of disease. *Stroke* . 2007;38:2592-2594.
5. Chimowitz MI, Lynn MJ, Derdeyn CP, Turan TN, Fiorella D, Lane BF, Janis LS, Lutsep HL, Barnwell SL, Waters MF, Hoh BL, Hourihane JM, Levy EI, Alexandrov AV, Harrigan MR, Chiu D, Klucznik RP, Clark JM, McDougall CG, Johnson MD, Pride GL, Jr, Torbey MT, Zaidat OO, Rumboldt Z, Cloft HJ, SAMMPRIS Trial Investigators. Stenting versus aggressive medical therapy for intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* . 2011;365:993-1003.
6. Park JH, Kwon HM, Roh JK. Metabolic syndrome is more associated with intracranial atherosclerosis than extracranial atherosclerosis. *Eur J Neurol* . 2007;14:379-386.
7. Rincon F, Sacco RL, Kranwinkel G, Xu Q, Paik MC, Boden-Albala B, Elkind MS. Incidence and risk factors of intracranial atherosclerotic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *Cerebrovasc Dis* . 2009;28:65-71.
8. Park HY, Kyeong-Ho, Park DS, Lee HS, Chang H, Kim YS, Cho KH. Correlation between insulin resistance and intracranial atherosclerosis in patients with ischemic stroke without diabetes. *J Stroke Cerebrovasc Dis* . 2008;17:401-405.
9. Bang OY, Kim JW, Lee JH, Lee MA, Lee PH, Joo IS, Huh K. Association of the metabolic syndrome with intracranial atherosclerotic stroke. *Neurology* . 2005;65:296-298.

10. Bang OY, Lee PH, Yoon SR, Lee MA, Joo IS, Huh K. Inflammatory markers, rather than conventional risk factors, are different between carotid and MCA atherosclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* . 2005;76:1128-1134.
11. Park JH, Hong KS, Lee EJ, Lee J, Kim DE. High levels of apolipoprotein B/AI ratio are associated with intracranial atherosclerotic stenosis. *Stroke* . 2011;42:3040-3046.
12. Takahashi W, Ohnuki T, Ohnuki Y, Kawada S, Takagi S. The role of high-sensitivity C-reactive protein in asymptomatic intra- and extracranial large artery diseases. *Cerebrovasc Dis* . 2008;26:549-555.
13. Kim BS, Jung HS, Bang OY, Chung CS, Lee KH, Kim GM. Elevated serum lipoprotein(a) as a potential predictor for combined intracranial and extracranial artery stenosis in patients with ischemic stroke. *Atherosclerosis* . 2010;212:682-688.
14. Lopez-Cancio E, Dorado L, Millan M, Reverte S, Sunol A, Massuet A, Mataro M, Galan A, Alzamora M, Toran P, Pera G, Davalos A, Arenillas JF. The population-based Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis Study (ASIA): Rationale and design. *BMC Neurol* . 2011;11:22.
15. Lopez-Cancio E, Dorado L, Millan M, Reverte S, Sunol A, Massuet A, Galan A, Alzamora MT, Pera G, Toran P, Davalos A, Arenillas JF. The Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis (AsIA) study: Prevalence and risk factors. *Atherosclerosis* . 2012;221:221-225.
16. Marrugat J, Vila J, Baena-Diez JM, Grau M, Sala J, Ramos R, Subirana I, Fito M, Elosua R. Relative validity of the 10-year cardiovascular risk estimate in a population cohort of the REGICOR study. *Rev Esp Cardiol* . 2011;64:385-394.
17. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr, International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* . 2009;120:1640-1645.
18. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* . 1985;28:412-419.
19. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Med Clin (Barc)* . 2001;117:530-533.
20. Baumgartner RW, Mattle HP, Schroth G. Assessment of  $\geq 50\%$  and  $< 50\%$  intracranial stenoses by transcranial color-coded duplex sonography. *Stroke* . 1999;30:87-92.
21. Bang OY, Lee MA, Lee JH, Kim JW, Lee PH, Joo IS, Huh K. Association of Metabolic Syndrome and C-reactive Protein Levels with Intracranial Atherosclerotic Stroke. *J Clin Neurol* . 2005;1:69-75.
22. Ovbiagele B. Association of the metabolic syndrome with intracranial atherosclerotic stroke. *Neurology* . 2006;66:459; author reply 459.
23. Park JH, Kwon HM, Roh JK. Metabolic syndrome is more associated with intracranial atherosclerosis than extracranial atherosclerosis. *Eur J Neurol* . 2007;14:379-386.
24. Bang OY, Saver JL, Liebeskind DS, Pineda S, Yun SW, Ovbiagele B. Impact of metabolic syndrome on distribution of cervicocephalic atherosclerosis: data from a diverse race-ethnic group. *J Neurol Sci* . 2009;284:40-45.
25. Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Vila-Caballer M, Fortuno A, Belouqui O, Zalba G, Burks D, Diez J, Andres V. Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2008;28:2187-2194.
26. D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi DM, D'Armiento MR, Crimi G, Abete P, Palinski W, Condorelli M, Napoli C. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* . 2001;32:2472-2479.
27. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* . 2005;111:932-939.
28. Choi HY, Kim S, Yang SJ, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. Association of adiponectin, resistin, and vascular inflammation: analysis with 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2011;31:944-949.
29. Maas R, Xanthakis V, Polak JF, Schwedhelm E, Sullivan LM, Benndorf R, Schulze F, Vasan RS, Wolf PA, Boger RH, Seshadri S. Association of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA with carotid artery intimal media thickness in the Framingham Heart Study offspring cohort. *Stroke* . 2009;40:2715-2719.

# TABLAS REGICOR PARA EL CÁLCULO DEL RIEGO VASCULAR

