

**ATEROSCLEROSI INTRACRANIAL:
MARCADORS DE RECURRENCIA
D'ESDEVENIMENT ISQUÈMIC I GRAVETAT**

Tesi defensada per

ANDREU MASSOT TARRÚS

Per aspirar al

Grau de Doctor en Medicina i Cirurgia

Directors: Joan Montaner Villalonga i José Álvarez Sabín

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Any 2013

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral és el resultat del treball realitzat en els últims anys en l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron. Tots els seus membres, incloent al personal de la Unitat d'Ictus, el Laboratori d'Investigació Neurovascular i la Unitat d'Estadística han estat imprescindibles pel seu desenvolupament. Voldria destacar l'important participació de tots ells i en especial l'inestimable col·laboració dels doctors Juan Arenillas, Pilar Delgado, Anna Rosell, Míriam Navarro-Sobrino i Israel Fernandez així com de l'Ana Penalba i la Dolors Giralt.

Finalment, voldria agrair als directors de la tesi Drs. José Álvarez-Sabín i Joan Montaner el seu recolzament i valuosos consells.

Espero que el treball realitzat permeti avançar en el nostre coneixement de les malalties cerebrovasculars i contribuir en un futur a la millora del diagnòstic i tractament dels pacients que les pateixen.

ÍNDIX

Agraïments	2
Índex	3
Índex d'acrònims	6
1. Introducció	10
1.1. Ictus isquèmic i aterosclerosi intracranial de gran vas	11
1.1.1. Definició i epidemiologia	11
1.1.2. Diagnòstic no invasiu de les estenosis intracranials (DTC, angioTC/RM)	15
1.1.3. Factors de risc, pronòstic i escales de risc	24
1.1.4. Paper de l'índex turmell-braç (ITB) en la malaltia ateroscleròtica	32
1.2. L'aterosclerosi, una malaltia inflamatòria crònica	33
1.2.1. Proteïna C reactiva (hs-PCR) i aterosclerosi	36
1.2.1.1. La hs-PCR com a factors pronòstic	37
1.2.1.2. Paper dels polimorfismes de la PCR	40
1.2.2. Aterosclerosi i altres marcadors d'inflamació (Lp-PLA2, E-selectina, ICAM-1) i d'inhibició de la fibrinòlisis (PAI-1)	42
1.2.2.1. Lipoproteïna-associada a fosfolipasa A2 (Lp-PLA2)	42
1.2.2.2. Molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina i ICAM-1)	46
1.2.2.3. Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus I (PAI-1)	47
1.3. Cèl·lules progenitores endotelials (CPE) i factors angiogènics en la vasculopatia ateroscleròtica	50
1.3.1. Definició, origen i caracterització de les CPE	50
1.3.2. Relació dels factors angiogènics de creixement (AGF) amb les CPE	55
1.3.3. CPE i AGF en la malaltia cerebrovascular	56

2. Objectius	63
3. Materials i mètodes	65
3.1. Selecció de pacients, variables clíniques basals i seguiment.	66
3.2. Protocol de l'ITB	72
3.3. Obtenció i anàlisi de les mostres biològiques	73
3.3.1. Determinació de la hs-PCR, PLA-A2, E-selectina, ICAM-1, PAI-1 i AGF	73
3.3.2. Determinació del polimorfisme C1444T de la PCR	78
3.3.3. Determinació de les CPE (citometria de flux)	78
3.4. Anàlisi estadístic	82
4. Resultats (copia de publicacions)	83
<u>Article 1:</u> C-Reactive Protein Gene C1444T Polymorphism and Risk of Recurrent Ischemic Events in Patients with Symptomatic Intracranial Atherostenoses (Cerebrovasc Dis 2009;28:95–102)	
<u>Article 2:</u> Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease (Atherosclerosis 2011;218:181-7)	
<u>Article 3:</u> Decreased levels of angiogenic factors in intracranial atherosclerotic disease despite severity-related increase in endothelial progenitor cell counts (Cerebrovasc Dis Cerebrovasc Dis 2013;35:81–88)	
<u>Article 4:</u> Predictive value of ankle-brisk and biomarkers in symptomatic intracranial atherosclerotic disease recurrence (Submitted in Stroke, March 2013)	
5. Síntesi dels resultats i discussió	107
5.1. Anàlisi de la població amb malaltia ateroscleròtica intracranial de gran vas (MAIC) simptomàtica	108
5.2. Relació de les proteïnes marcadors d'inflamació (hs-PCR, Lp-PLA2, E-selectina, ICAM) i d'inhibició de la fibrinòlisis (PAI-1) amb l'evolució de la MAIC simptomàtica	109
5.3. Paper del polimorfisme C1444T de la PCR en el pronòstic dels pacients amb MAIC simptomàtica.	115

5.4. Relació de les CPE i els AGF amb la MAIC i la seva gravetat.	117
5.5. Paper de l'ITB en el pronòstic de la MAIC simptomàtica	119
5.6. Combinació dels biomarcadors d'inflamació i inhibició de la fibrinòlisis amb escales clíniques pronòstiques de risc de recurrència d'ictus (ESRS) en pacients amb MAIC simptomàtica	120
6. Conclusions	122
7. Annex	124
8. Bibliografia	141

Índex d'acrònims

AAS, Àcid Acetilsalicílic

AB, Arteria Basilar

ACI, Arteria Caròtida Interna

ACM, Arteria Cerebral Mitja

ACP: Arteria Cerebral Posterior

AGF, factors angiogènics de creixement (de l'anglès *Angiogenic Growth Factors*)

AIT, Atac Isquèmic Transitori

ARM, Angiografia per Ressonància Magnètica

ARA-II, Antagonistes del Receptor de l'Angiotensina II

ASA, associació americana d'ictus (de l'anglès *American Stroke Association*)

ATC, Angiografia per Tomografia Computeritzada

AUC, àrea sota la corba (de l'anglès *Area Under the Curve*)

AV, Arteria/es Vertebrals

COR (corba), corba de característiques operatives del receptor (de l'anglès *Receiver Operator Characteristic Curve*)

CPE, Cèl·lules Progenitores Endotelials

CV, Cardiovascular

DSA, angiografia de sostracció digital (de l'anglès *Digital Subtraction Angiography*)

DTC, Doppler Transcranial

eON: òxid nítric endotelial (de l'anglès *endothelial Oxide Nitric*)

FA, Fibril·lació Auricular

FGF, factor de creixement dels fibroblasts (de l'anglès *Fibroblast Growth Factor*)

FRCV, Factors de Risc Cardiovascular

HDL (colesterol), lipoproteïnes d'alta densitat (de l'anglès *High-Density Lipoprotein*)

HGF, factor de creixement dels hepatòcits (de l'anglès *Hepatocyte Growth Factor*)

hs-PCR, Proteïna C Reactiva d'alta sensibilitat (de l'anglès *high sensitivity*)

HTA, Hipertensió Arterial

IAM, Infart Agut de Miocardi

ICAM-1, molècula d'adhesió intercel·lular-1 (de l'anglès *Intercellular Adhesion Molecule-1*)

IGT, Índex Genoll Turmell

IL-6, Interleucina 6

IMT, índex íntima-mitja (de l'anglès *Intima Media Thickness*)

ITB, Índex Turmell-Braç

KDa, KiloDalton

KDR, receptor de domini d'inserció de quinasa (de l'anglès *Kinase-insert Domain-containing Receptor*)

LDL (colesterol), lipoproteïnes de baixa densitat (de l'anglès *Low-Density Lipoprotein*)

LysoPC, Lisofosfatidilcolina (de l'anglès *Lysophosphatidylcholine*)

MAIC, Malaltia Ateroscleròtica Intracranial de gran vas

MAP, Malaltia Arterial Perifèrica

MCP-1, proteïna quimiotàctica de monòcits-1 (de l'anglès *monocyte chemotactic protein-1*)

MMP-9, metal·loproteasa de matriu 9 (de l'anglès *Matrix Metalloproteinase 9*)

mRS, escala de Rankin modificada (de l'anglès *modified Rankin Scale*)

NEFA, àcids grassos oxidats no esterificats (de l'anglès *Non-Esterified Fatty Acids*)

NIHSS, l'escala d'ictus de l'institut nacional de salut (de l'anglès *Nacional Institute of Health Stroke Scale*)

NMDA: àcid N-metil-D-aspartic (de l'anglès *N-Methyl-D-Aspartic Acid*)

PAI-1, Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1 (de l'anglès *Plasminogen Activator Inhibitor-1*)

PBS, tampó fosfat salí (de l'anglès *Phosphate Buffered Saline*)

PDGF, factor de creixement derivat de plaquetes (de l'anglès *Platelet-Derived Growth Factor*)

PSV: Velocitat pic o sistòlica màxima (de l'anglès *Peak Systolic Velocity*)

RM, Ressonància Magnètica

rt-PA, activador del plasminogen tissular recombinant (de l'anglès *recombinant tissular Plasminogen Activator*)

SAA, amiloide A sèric (de l'anglès *Serum Amyloid A*)

SMet, Síndrome Metabòlic

SNP, polimorfismes de nucleòtid únic (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*)

TA, Temperatura Ambient

TC, Tomografia Computeritzada

TNF- α , factor de necrosi tumoral (de l'anglès *Tumoral Necrosis Factor-alpha*)

TSA, Troncs Supraaòrtics

UFC, Unitat Formadora de Colònies

uPA, activador del plasminogen tipus uroquinasa (de l'anglès *urokinase-type Plasminogen Activator*)

VB, Vertebrobasilar

VCAM-1, molècula 1 d'adhesió de cèl·lules vasculars (de l'anglès *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)

VEGF, factor de creixement vascular endotelial (de l'anglès *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat (de l'anglès *Very Low Density Lipoprotein*)

Vm, Velocitat mitja

VSG, Velocitat de Sedimentació Globular

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Ictus isquèmic i aterosclerosi intracranial de gran vas

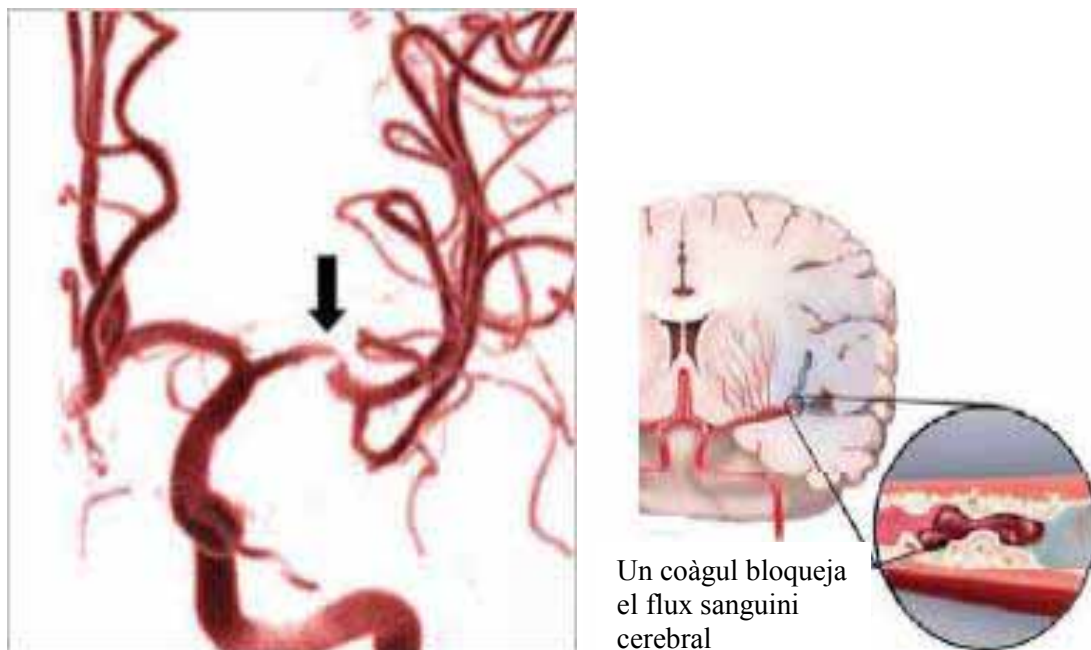
1.1.1. Definició i epidemiologia

En la nostra societat l'ictus és la primera causa de mortalitat per entitats específiques en dones i la tercera en homes, així com la primera causa de discapacitat a llarg termini en persones adultes i per tant causa d'una important despesa sanitària i en prestacions socials.

A Espanya, l'ictus té una prevalença de 500-600 casos/100.000 habitants i una incidència anual de 150-200 casos/100.000 habitants. Això significa que a Catalunya unes 40.000 persones han patit un ictus i hi ha més de 11.000 nous ictus cada any. A més, la seva incidència no ha disminuït en els últims anys degut a l'increment de l'esperança de vida i de la seva incidència en les dones (1-3).

El 85% de tots els ictus són isquèmics. L'ictus isquèmic és una entitat clínica multifactorial que pot ser causada per una gran varietat de patologies vasculares. Així, aproximadament un 35% dels ictus isquèmics estan relacionats amb l'aterosclerosi dels troncs supraaòrtics (TSA) o de les arteries intracerebrals de gran calibre (infarts aterotrombòtics); un 25% es deuen a un èmbol gestat en les cavitats cardíques (infart cardioembòlic); prop del 15% es deuen a oclusió d'arteries de petit calibre (infarts lacunars per microangiopatia cerebral) i un 10% són conseqüència d'altres etiologies (arteriopaties inflamatòries infeccionses i no infeccioses, vasoespasme, estats protrombòtics, etc.). A més, s'estima que en un 15-20% dels infarts isquèmics no s'arriba a determinar l'etiologia després d'un estudi complet (infart d'origen indeterminat).

Figura 1. Esquema d'una estenosi ateroscleròtica intracranial de gran vas (adaptat de *Heart and Stroke Foundation of Canada*).

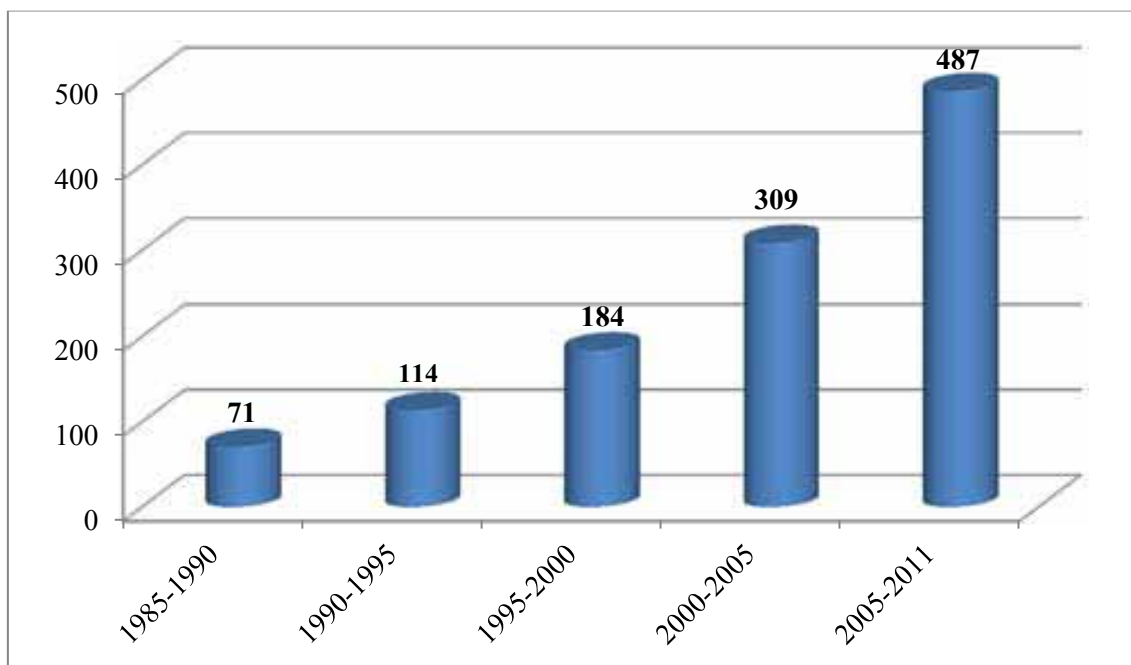


Cada tipus de patologia responsable de l'ictus presenta les seves pròpies característiques fisiopatològiques, pronòstic i risc de nous episodis isquèmics.

La malaltia ateroscleròtica intracranial de gran vas (MAIC), es caracteritza pel desenvolupament de lesions ateroscleròtiques en les grans artèries intracrànies que ocasionen una reducció del calibre o estenosi. Cal tenir en compte però, que l'aterosclerosi és una malaltia difusa al llarg de la paret arterial i que, segons els mecanismes que participin en l'aterogènesi i el grau de remodelació del vas, és possible que una lesió ateroscleròtica no arribi a produir una estenosi (4).

La MAIC provoca el 8-10% de tots els ictus isquèmics en individus d'ètnia caucàsica (5-7), representa la causa més freqüent d'ictus isquèmic en pacients de llinatge asiàtic (amb fins un terç dels infarts cerebrals i la meitat dels AIT causats per aquesta malaltia en pacients xinesos (8-10) i és freqüent en hispans i afroamericans. Per tot això, es creu que la MAIC pot ser la causa més freqüent d'ictus al món (5) i, consegüentment, la recerca centrada en aquesta patologia s'ha incrementat de forma exponencial en les dos últimes dècades.

Figura 2. Articles publicats referents a estenosis intracranials en les últimes dècades. Les barres representen el nombre d'articles publicats en literatura anglesa des de 1985 fins l'actualitat dividit en períodes de 5 anys. Termes de recerca utilitzats en Medline: *intracranial stenosis*. Límits: llengua anglesa (adaptat d'Arenillas, Stroke 2011(11)).



Tanmateix, la importància de la MAIC pot ser fins hi tot més important del que està estimat, ja que les estenosis intracranials representen només l'estadi més avançat de la malaltia i la MAIC no estenòtica pot ser molt més comú. A més, les estenosis asimptomàtiques es desenvolupen de forma silenciosa durant anys fins que esdevenen sobtadament simptomàtiques al provocar un ictus. En aquest sentit, l'estudi de 339 autòpsies en morts causades per ictus isquèmic o hemorràgic a París, va mostrar una prevalença sorprenentment alta tant de plaques (59%) com d'estenosis intracranials (37%) (12). A més, estudis amb Doppler transcranial (DTC) en població asiàtica asimptomàtica han mostrat prevalences d'estenosis intracranials del 5.9 al 24.5% (13-15) i, en individus caucàsics de risc en l'àrea metropolitana de Barcelona, del 8.6% (16). Desafortunadament, el coneixement que actualment tenim sobre la MAIC és encara escàs en comparació amb el de l'aterosclerosi en altres territoris vasculars. S'imposa doncs la necessitat d'avançar en l'estudi dels mecanismes patogènics implicats en aquesta malaltia i els factors que en determinen el pronòstic, marc en el que es centra la present tesi.

Principals entitats que poden causar estenosis intracranials

Existeixen multitud d'entitats que poden causar estenosis intracranials, pel que la selecció dels pacients amb estenosis d'origen ateroscleròtic requereix d'un procés intens de diagnòstic diferencial, que inclou analitzar els factors de risc cardiovascular (FRCV) i les característiques clíniques de l'episodi isquèmic, així com la realització de múltiples probes diagnòstiques per descartar, amb el major grau de certesa possible, la resta de possibles entitats. Veure **Taula 1**.

Taula 1. Entitats que poden causar estenosis de les arteries intracranials (adaptat d'Arenillas, Tesis doctoral 2003(17)).

1. Aterosclerosi intracranial
2. Estenosis originades després de la recanalització parcial d'un èmbol impactat en un segment arterial
3. Dissecció de les arteries intracranials a) Post-traumàtiques b) Espontània c) Displàsia fibromuscular cefàlica d) Col·lagenopaties congènites (Osteogènesi imperfecta)
4. Arteriopatia infecciosa. a) Vasculitis per virus varicel·la zòster b) Meningitis c) Vasculitis purulenta (bacteriana, fúngica)
5. Arteritis no infeccioses a) Arteritis de cèl·lules gegants b) Arteritis de Takayasu c) Síndrome d'anticossos antifosfolípid primari d) Arteritis associada a malalties sistèmiques (malaltia de Behçet, Sjögren, Lupus Eritematos Sistèmic)
6. Arteriopaties no inflamatòries a) Malaltia de moyamoya b) Síndrome de Sneddon c) Angiopatia postràdica d) Vasculopatia per consum crònic de cocaïna e) Estats protrombòtics: deficiència de proteïna S f) Anèmia de cèl·lules falciformes g) Compressió des d'estructures veïnes: craneofaringioma, plasmocitoma h) Infiltratives - Gliomatosis leptomeníngea - Limfoma endovascular g) Vasoespasme - Hemorràgia subaracnoïdea - Vasoconstricció segmentària cerebral reversible - Vasculopatia peripartum - Vasculopatia hipertensiva. Eclàmpsia

1.1.2. Diagnòstic no invasiu de les estenosis intracranials

La confirmació definitiva de les estenosis intracranials ateroscleròtiques s'obté mitjançant l'estudi histopatològic. *In vivo*, la definició d'estenosi intracranial depèn de la tècnica diagnòstica utilitzada per la seva detecció.

L'arteriografia convencional segueix considerant-se l'exploració de referència amb la que s'han de comparar els mètodes de diagnòstic no invasius: DTC, ARM i l'ATC. La principal avantatge de l'arteriografia sobre les tècniques no invasives radica en que permet la mesura precisa del percentatge de reducció de la llum arterial (18) i ofereix informació directa sobre l'estat de la circulació colateral. Per altra banda, és una exploració invasiva que comporta un risc no menyspreable de complicacions, pel que no pot utilitzar-se de forma rutinària en tots els pacients amb un ictus isquèmic.

La dependència tradicional de tècniques invasives com l'arteriografia convencional, ha estat un obstacle en l'estudi de la MAIC i havia provocat que se'n subestimés la prevalença real. Gracies a l'aparició de mètodes no invasius fiables, com el DTC, l'ARM i l'ATC, l'estudi de la patologia de les grans arteries s'ha fet accessible a la pràctica clínica habitual, i el coneixement sobre la MAIC s'ha incrementat. Tot i així, aquest coneixement s'ha basat tradicionalment en la detecció d'estenosis intracranials hemodinàmicament rellevants i porta implícit una sèrie de limitacions: 1) Es restringeix a l'estadi més avançat de la MAIC; 2) És incapaç de diferenciar l'aterosclerosi d'altres causes d'estenosis i 3) No aporta informació sobre la composició histopatològica i l'activitat de la placa ateroscleròtica. Aquest últim punt sembla especialment rellevant, ja que la gravetat de la placa es caracteritza no només pel grau d'estenosi sinó també per la presència de trombus, hemorràgies intraplaca, neovascularització, alt contingut de lípids o infiltració per cèl·lules inflamatòries, totes elles causes conegudes d'instabilitat de la placa ateroscleròtica en la vasculatura extracranial (19). Per contra, les noves tècniques d'imatge com la RM d'alta resolució o els ultrasons intravasculars, permeten una avaluació directa de les plaques ateroscleròtiques intracranials. Aquest nou concepte pot implicar importants canvis en la manera de diagnosticar i tractar la MAIC. Els ultrasons intravasculars han demostrat la presència d'hemorràgia intraplaca *in vivo* en estenosis intracranials simptomàtiques, la qual cosa indica que les plaques ateroscleròtiques intracranials poden esdevenir simptomàtiques després de complicacions anàlogues a les que tenen lloc en plaques extracranials o coronaries (20). La RM 3T d'alta resolució també permet identificar hemorràgies intraplaca i, a més,

avaluar altres marcadors d'activitat (21) i obtenir imatges directes de plaques no estenòtiques, potencials causes d'infarts cerebrals d'origen indeterminat que s'obviarien amb l'ARM (22).

Els mètodes diagnòstics utilitzats per seleccionar als pacients inclosos en aquesta tesi han estat el DTC, l'ARM i l'ATC; capaços de detectar les estenosis que causin alteracions morfològiques o hemodinàmiques sobre la llum del vas, però no de proporcionar informació sobre altres alteracions en la paret arterial causades per l'aterosclerosi, naturalesa histopatològica o activitat de la lesió vascular subjacent. Això implica que en els pacients estudiats, l'aterosclerosi intracranial es troba en una fase avançada o estenòtica. Per aquest motiu, en aquesta tesi en allò successiu, el terme aterosclerosi intracranial de gran vas es referirà de manera implícita a l'existència d'estenosis ateroscleròtiques en les grans arteries intracranials.

Doppler transcranial en la detecció d'estenosis intracranials

El DTC permet detectar les alteracions hemodinàmiques provocades per la reducció focal del calibre arterial. Un cert grau d'estretament del lumen ha d'estar present abans que una estenosi produeixi una alteració detectable del flux. Aquest llindar correspon a aproximadament al 50% en l'àrea de secció. A més, les estenosis importants produeixen alteracions en les característiques del flux arterial fent que aquest passi de laminar, caracteritzat per una ona d'espectre reduït en el que la majoria de l'energia es concentra en la porció perifèrica de la mateixa, a un flux alterat no-laminar (en anglès "*disturbed*"), produint un eixamplament de l'espectre amb un augment dels components de baixa freqüència en la sístole. Si l'estenosi és greu, tindran lloc fenòmens de turbulència, en els que les partícules del flux es mouen de manera caòtica. Normalment, la màxima velocitat s'assoleix en el punt de màxima reducció del calibre, mentre que els fenòmens de turbulència tenen lloc en el punt immediatament distal a l'estenosi. Les alteracions del flux en les estenosis més greus donen lloc a vibracions de la paret arterial, detectables en forma de sorolls que poden variar entre sons secs de baixa freqüència a murmuris musicals, segons la co-vibració de la paret arterial sigui no-harmònica o harmònica respectivament (23,24).

Els criteris per diagnosticar una estenosi intracranial utilitzats en els articles d'aquesta tesi, es basen en els descrits per Ley-Pozo i Ringelstein per la circulació carotídia,

generalitzables al sistema VB amb la excepció de la xifra de Vm màxima considerada com a umbral (25). Aquests criteris són:

1) Acceleració del flux: Vm del flux sanguini a una profunditat circumscrita superior a 80cm/sec. En el cas de les arteries del sistema VB la xifra de Vm màxima podria ser 10-20 cm/seg inferior.

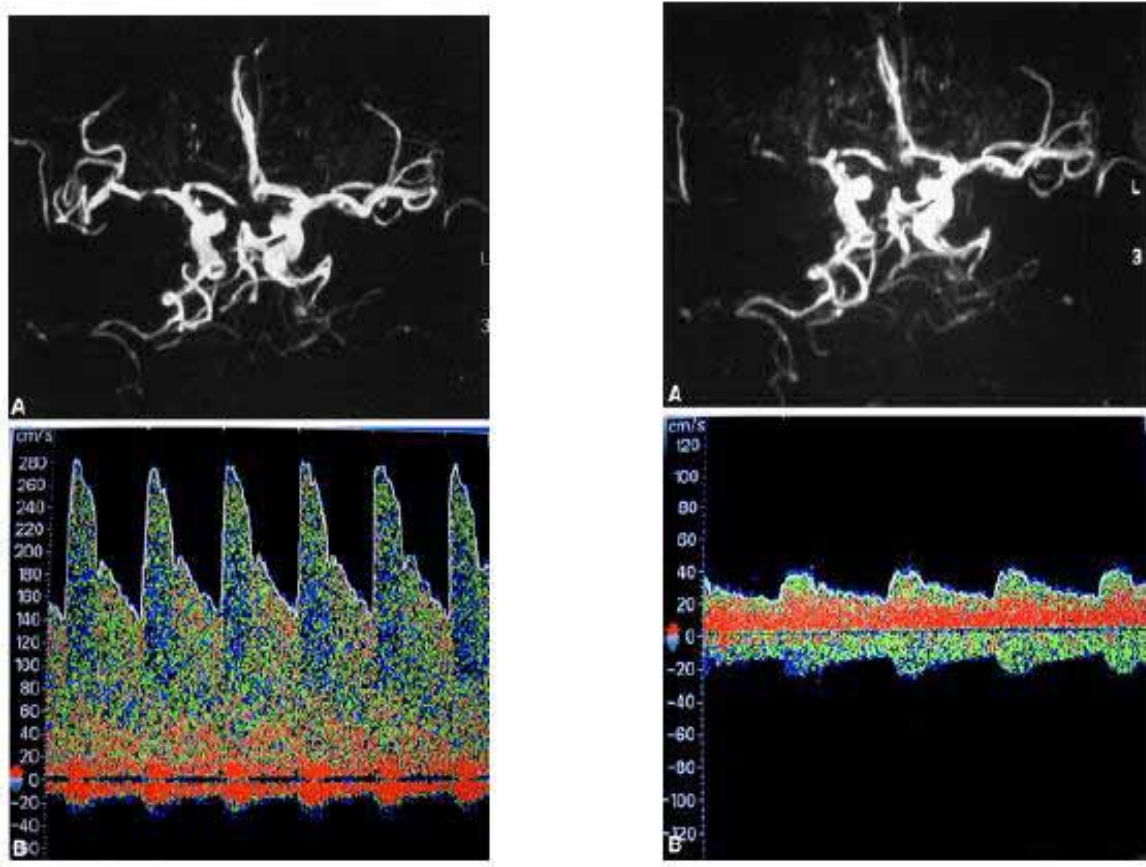
2) Alteració del flux amb increment de l'espectre i dels components de baixa freqüència en la sístole o durant tot el cicle cardíac.

3) Per diferenciar velocitats de flux altes degudes a una hiperperfusió hemisfèrica, els canvis en la velocitat han de ser "circumscrius", és a dir, restringits a una o 2 profunditats d'insonació (5-10 mm), amb un patró de flux preestenòtic (disminució del component diastòlic) i postestenòtic (esmoreïment de la velocitat amb aplanament de l'ona). Els punts de tall per l'esmoreïment postestenòtic són una disminució de 50 cms/s de la PSV i <30 cm/s de la Vm.

4) Diferències en la Vm de flux en ambos cantons superiors a 30 cm/sec.

5) Co-vibracions de la paret arterial, incloent sons no harmònics de baixa freqüència i murmurs musicals, identificables en l'espectre com energies de baixa freqüència de distribució simètrica, holosistòlica i paral·leles a la línia base. Si apareixen de forma circumscrita son indicatives d'estenosi greu.(24,25, Adaptat d'Arenillas, Tesis doctoral 2003(17))

Figura 3. Visualització per Doppler d'una estenosi intracranial (adaptat de Wong et al, Stroke 2002 (26)).



Mesura de les estenosis per DTC:

La quantificació del grau d'estenosi per DTC es veu dificultada per la impossibilitat de visualitzar les arteries en al menys dos plans perpendiculars i al desconeixement de l'angle d'insonació exacte. No obstant, és possible realitzar una aproximació atenent als següents punts:

- Com ja s'ha comentat, el DTC només detecta estenosis que produeixen una reducció d'un 50% en l'àrea de secció.
- La presència d'una acceleració circumscriu en absència d'alteracions del flux correspondria a una reducció del 60-70% de l'àrea de secció.
- L'associació de fenòmens de turbulència és propi d'estenosis que causen una reducció de diàmetre superior al 80%.

En aquesta tesi, s'utilitzarà la Vm màxima segons els valors descrits per Aaslid i col·laboradors en l'estudi del vasoespasme en les hemorràgies subaracnoïdes per dividir les estenosis en lleus (80-119 cm/seg), moderades (120-139 cm/seg) i greus (>140 cm/seg) (27). Degut al moment en que es va realitzar el reclutament dels pacients, no s'han utilitzat posteriors actualitzacions dels criteris. En aquest sentit, cal destacar que en els assajos poblacionals SONIA i SAMMPRIS, van validar mitjançant angiografia per catèter l'increment de velocitat per diàmetres d'estenosis superiors al 50% i 70%. Aquests estudis descriuen com a Vm de tall 100 i 80 cm/s per estenosis >50% en l'ACM i AV/AB respectivament (28,29).

Mencionar a més, que existeixen també criteris validats en funció de la PSV. Així doncs, s'ha observat que estenosis de l'arteria caròtida interna (ACI) intracranial superiors al 70% es corresponen amb PSV >200cm/s (30) i que les estenosis d'ACM es poden classificar en lleus, moderades o greus segons valors de PSV corresponents a 140-209, 201-279 i >280 cm/seg. respectivament (31). Per la resta d'arteries intracranials, les estenosis es poden classificar en inferiors o superiors al 50% en funció de les següents velocitats de tall de PSV: $\geq 120/\geq 155$ cm/s per l'ACA; $\geq 100/\geq 145$ cm/s per l'ACP i $\geq 100/\geq 140$ cm/s per l'AB (32).

Cal tenir en compte però que una classificació basada en la velocitat de flux, sense tenir en compte la resta de fenòmens hemodinàmics integrats en la definició d'estenosi, serà sempre insuficient. La fiabilitat diagnòstica millora si a la velocitat s'afegeix, per exemple, un *ratio* preestenòtic-postestenòtic. Un *ratio* superior a 3 indica un 70% d'estenosi en l'ACM i les AV/AB.(33,34). A més, s'ha de tenir present que la fiabilitat del DTC millora en absència de lesions significatives de les caròtides cervicals, ja que aquestes poden causar tant falsos negatius en el context d'un patró postestenòtic distal a les mateixes, com falsos positius al poder-se confondre l'acceleració del flux a través de les arteries comunicants que funcionen com a vies de suplència, amb una estenosi intracranial. En segon lloc, com que el diàmetre arterial no pot ser mesurat per DTC, el volum de flux sanguini tampoc pot ser estimat i individus amb arteries de petit calibre poden presentar velocitats relativament altes i viceversa, tot i haver una anatomia del vas d'altra banda normal. Finalment, com que les velocitats de flux disminueixen amb l'edat (35) no és prudent utilitzar valors estimats de velocitat rígids pel diagnòstic.

En tot cas, la sensibilitat i especificitat del DTC per detectar estenosis de sífó carotidi i segments proximals de l'ACM és molt elevada en mans experimentades, agafant com a referència l'arteriografia convencional. En la sèrie de Ley-Pozo i Ringelstein es van assolir xifres de sensibilitat del 94.1% i 85.7% per la detecció d'estenosis de sífó carotidi i segment M1 respectivament, i d'especificitat del 96.7% i 98.7% (25). En la sèrie de Valaikiene es van assolir xifres de sensibilitat del 71% i especificitat del 100% per estenosis de l'ACI intracranial >70% (30). La fiabilitat diagnòstica del DTC és discretament inferior en les estenosis del sistema VB, degut a la major dificultat per insonar tot el trajecte i trobar angles d'insonació òptims. Tot i així, en la sèrie de Rorick es va observar una sensibilitat superior al 80% (36,37).

El DTC es doncs una eina molt útil que permet a través de les diferents finestres òssies (temporal, transforaminal occipital i orbital), obtenir informació de forma no invasiva, en temps real, amb un cost molt baix i repetible tants cops com es vulgui. Les seves principals limitacions són:

- La dependència de l'experiència de l'explorador.
- La carència d'una adequada finestra acústica temporal en prop del 15-20% dels pacients, especialment en dones d'avançada edat. Aquest problema pot resoldre's en gran mesura gràcies a la utilització d'ecocontrast (38,39).
- El desconeixement de l'angle d'insonació exacte, que fa que la velocitat estimada del flux pugui no correspondre's amb la real.
- La dificultat per insonar completament alguns segments arterials, com el segment M2 de l'ACM, V3 i V4 de les AV o P2 de les ACP (40). En aquest sentit, la capacitat diagnòstica del DTC és àmpliament superada pel Dúplex transcranial, que permet visualitzar els segments arterials amb les seves relacions anatòmiques i realitzar una correcció de l'angle d'insonació.(32,41) Degut al període en que es va realitzar el reclutament i seguiment dels pacients dels estudis d'aquesta tesi, les exploracions es van realitzar amb Doppler i no amb Dúplex TC. Tot i així, la estimació dels valors predictius negatius (86-94% per ACM i 88% per AV/AB) i positius (36-73% per ACM i 93% per AV/AB) per excloure la presència d'estenosis intracranials amb DTC, indiquen que aquesta és una eina fiable (34). En tot cas, es aconsellable realitzar un test

confirmatori, i per aquest motiu en tots els nostres pacients es van contrastar les troballes del DTC mitjançant ATC o ARM.

Angiografia per Ressonància Magnètica (ARM)

L'estudi amb ARM presenta l'avantatge d'una excel·lent resolució espacial, evitant l'ús de radiacions ionitzants i proporcionant una alta reproductibilitat.

L'ARM ha demostrat ser capaç d'obtenir informació morfològica precisa de les artèries intracranials de gran calibre sense precisar l'ús de gadolini. La RM de temps de vol (*time of flight*) utilitza com a base física per generar contrastos els espins no saturats en la sang en el teixit adjacent estacionari, que es manté saturat (42,43). Utilitzant seqüències tridimensionals de temps de vol, l'ARM ofereix una bona equivalència amb l'angiografia de sostracció digital (DSA) per la detecció d'estenosis intracranials superiors al 50% amb una sensibilitat, especificitat i precisió del 92%, 91% i 91% respectivament.

Els inconvenients principals de les seqüències temps de vol són derivats de la saturació de l'espín en situacions de baix flux, la qual cosa pot conduir a la sobreestimació del grau d'estenosi i a la obtenció d'imatges de falsa oclusió. Aquest fenomen de buit de fluid indica, si més no, una regió de lumen extremadament estret i pot no afectar la pràctica clínica (44). Un altre problema important és l'aparició d'artefactes en forma de supressió de senyal (falsa oclusió o estenosi) en zones on estan presents gradients amplis de susceptibilitat magnètica, com en les porcions paracavernosa i supraclinoidea de l'ACI. Amb la intenció de millorar aquests punts dèbils, s'han incorporat avanços tècnics com l'*angle flip* variable, que aconsegueix incrementar el senyal del vas optimitzant els seus detalls morfològics, i la utilització de pols de transferència de magnetització (*magnetization transfer contrast pulses*), que aconsegueixen reduir el senyal provinent del teixit estacionari. Amb les millores tècniques descrites s'han obtingut xifres de sensibilitat del 100% i especificitat del 99% en la detecció d'estenosis intracranials. L'ARM amb aquest equipament és fins i tot capaç de graduar correctament el 80% de les estenosis inferiors al 70% i el 88% de les estenosis superiors al 70% (44-46).

El prolongat temps d'adquisició que inicialment requerien les seqüències de temps de vol s'ha reduït de forma notable (de 7-11 minuts a menys d'1 minut) mitjançant la

utilització de contrastos paramagnètics (*contrast-enhanced MRA*). Tanmateix, alguns autors han observat que l'ARM amb contrast és menys sensible i produeix una major sobreestimació de les estenosis que l'ARM de temps de vol, al menys en les artèries caròtides cervicals (47).

Com s'ha mencionat anteriorment, els mètodes convencionals d'angiografia no arriben a caracteritzar la presència de malaltia ateroscleròtica no oclusiva. Això requereix la visualització de la placa i la possibilitat de donar informació sobre la seva composició. En un petit estudi en pacients amb MAIC, la RM d'alta resolució va ser capaç d'observar petites plaques que no s'observaven amb ARM.(48) La detecció d'aquestes petites lesions pot ser rellevant, ja que la ruptura d'una placa no-oclusiva pot ser causa potencial d'un tromboembolisme.

Les ARM dels pacients inclosos en els treballs d'aquesta tesi es van ser realitzar amb un aparell d'1,5 Teslas, que utilitza seqüències tridimensionals de temps de vol, amb supressió per transferència de magnetització, *angle flip variable* i *TONE (tilted optimized nonsaturating excitation)*. Les imatges van ser reconstruïdes utilitzant les projeccions de màxima intensitat (*maximal intensity projection, MIP*). És a dir, es va comptar amb les tècniques que proporcionen a l'ARM una alta fiabilitat en el diagnòstic de les estenosis intracranials.

Angiografia per tomografia computeritzada (ATC)

Part dels pacients inclosos en els treballs d'aquesta tesi van ser estudiats mitjançant angiografia per tomografia computeritzada helicoïdal multitall (*multi-slice spiral CTA*) (49). Gràcies a la multiplicitat de corones de detectors d'aquests tomògrafs helicoïdals, és possible realitzar una exploració de totes les artèries de la base del crani en 10-40 segons i en un únic examen. Els primers tomògrafs helicoïdals tenien l'inconvenient de posseir un únic detector, amb el que la cobertura que assolien no superava els 6 cm d'un segment arterial. Les ATC multitall adquireixen les imatges amb major velocitat i aconsegueixen una major resolució (50).

Les principals avantatges que aportava aquesta tècnica respecte a l'ARM són la seva major accessibilitat i el reduït temps d'exploració. Com inconvenient afegit tenim la necessitat d'administrar contrast endovenós (l'ús del qual, en el cas dels contrastos iodats, està desaconsellat en la fase aguda de l'ictus isquèmic), el perill de l'exposició a

radiacions i limitacions tècniques relacionades amb la calcificació del mur arterial (51,52). Quan el vas no està calcificat, s'avalua la relació de l'estenosi amb el vas adjacent de mida normal. Si hi ha una calcificació, cal utilitzar tècniques postprocessament de projecció de màxima intensitat i reconstrucció multiplanar. L'ATC helicoidal multitall presenta unes xifres de sensibilitat i especificitat del 99% en la detecció d'estenosis intracranials, comparant amb l'angiografia convencional (53).

Les dades inicialment obtingudes es transfereixen a una estació de treball (*workstation*) on es poden reconstruir tridimensionalment amb una tècnica de projecció de màxima intensitat (MIP), fins aconseguir una imatge semblant a una arteriografia convencional. La tècnica de recuperació de volum relaciona, d'una forma tridimensional, els vasos amb el teixit circumdant i és útil per la eliminació d'artefactes. La reconstrucció multiplanar (MPR) permet l'estudi de les regions cobertes d'ós, com la porció intrapetrosa i cavernosa de l'ACI, l'estudi de les quals representava un dels punts dèbils de l'ATC ja que les imatges 3D no eren possibles degut a l'ós adjacent. L'equip utilitzat en els treballs que integren aquesta tesi compta amb tots aquests avanços.

Respecte al DTC, l'ATC ofereix l'avantatge de poder visualitzar els segments distals de l'ACM (40). Per contra, no aporta informació hemodinàmica en temps real com fa el DTC. Al comparar l'ATC amb l'ARM de temps de vol, trobem que l'ATC és mínimament invasiva, però els seus temps d'exploració són molt menors que els de l'ARM, fet que la converteix en primera elecció per l'estudi de pacients confusos, inestables o claustrofòbics. A més, no depèn de la velocitat del flux sanguini per generar el seu senyal, motiu pel qual és en general millor en comparació amb l'ARM per determinar el grau d'estenosi, ja que no està exposada a la sobreestimació per artefactes d'absència de flux i permet així obtenir millors imatges de les àrees postestenòtiques de baix flux (53). L'ARM però permet realitzar en el mateix examen seqüències per l'estudi del parènquima encefàlic (difusió, perfusió, etc) de gran interès, especialment durant la fase aguda de l'ictus.

En suma, la combinació del DTC amb l'ARM o ATC, mètode utilitzant en els treballs de la present tesi, ofereix una gran fiabilitat en el diagnòstic de les estenosis intracranials ateroscleròtiques (Adaptat d'Arenillas, Tesis doctoral 2003(17)).

1.1.3. Factors de risc, pronòstic i escales de risc.

Factors de risc:

Existeixen diferències importants en la prevalença de la MAIC segons la raça (54-56) Mentre que en els pacients blancs les estenosis ateroscleròtiques afecten preferentment a les arteries extracranials, en els individus de raça negra, asiàtica i d'origen hispànic les estenosis tenen lloc predominantment en les grans arteries intracranials.(6,7,57,58)

Són però els orientals qui amb més freqüència presenten MAIC. Diversos estudis angiogràfics demostren que, tant en japonesos (59) com en xinesos (60), les estenosis ateroscleròtiques es localitzen preferentment en les arteries intracerebrals.

Els pacients de raça negra també semblen tenir una major freqüència d'estenosis intracranials,(6,54,61,62) si bé d'una manera no tan pronunciada com els asiàtics (56). La menor freqüència d'afectació carotídia extracranial en negres americans respecte als caucàsics està ben establerta, però no sempre s'han trobat diferències en la proporció d'estenosis intracranials (58). També s'ha descrit una major incidència d'estenosis intracranials en pacients d'ascendència hispànica (6).

Alguns autors assenyalen que l'origen d'aquestes marcades diferències racials roman en diferències en l'estil de vida i el perfil dels FRCV (6), mentre que altres defensen l'existència d'una susceptibilitat genètica (56).

Així, s'ha suggerit que hi ha diferències en el perfil dels FRCV entre els pacients amb aterosclerosi extra- i intracranial: mentre que la HTA, el tabaquisme, l'abús d'alcohol, la dislipèmia i el sexe masculí serien comuns en els pacients amb malaltia carotídia extracranial, s'ha observat una major freqüència de diabetis i síndrome metabòlic (SMet) en els pacients amb aterosclerosi intracranial, sense ser constant en la literatura el predomini del sexe femení.(16,55,63-66)

Igualment, les arteries intracranials semblen especialment susceptibles als efectes aterogènics de l'estrès oxidatiu causat per la resistència a la insulina del SMet, fins i tot des dels estadis subclínic inicials (16,67,68).

També s'ha plantejat una diferent susceptibilitat pels FRCV segons l'ètnia arran d'haver-se observat que el SMet s'associa principalment a estenosis extracranials en caucàsics i en canvi a MAIC en hispans, asiàtics i afroamericans (69). Tot i així, un

estudi recent (16) ha evidenciat que el SMet també és un potent factor de risc de MAIC en caucàsics, suggerint que altres factors podrien determinar l'associació específica en cada ètnia.

Pronòstic:

L'aterosclerosi intracranial de gran vas és una entitat de mal pronòstic evolutiu, especialment en aquells pacients que han presentat un primer ictus isquèmic, ja que aquests pacients tenen un elevat risc de presentar nous episodis isquèmics, tant en els territoris cerebrovasculars dependents de les arteries estenosades com en altres territoris vasculars de l'organisme.

Concretament, segons els principals estudis publicats, el risc anual de recurrència d'ictus isquèmic en l'any posterior a un primer ictus és d'entre el 14% i el 10.4-15 % amb tractament amb warfarina i aspirina respectivament i la mortalitat per ictus, cardiopatia isquèmica o mort sobtada és entre el 2,5 i el 9% independentment del tractament profilàctic (70,71). Les recurrències d'ictus acostumen a produir-se en el mateix territori arterial en un 73% dels casos, són de perfil no lacunar i prop de la meitat resulten invalidants (72).

Els factors pronòstics es poden classificar en 2 categories: factors locals que confereixen vulnerabilitat a la placa ateroscleròtica i factors sistèmics que fan al pacient més vulnerable.

En la primera categoria estaria la presència d'estenosis d'alt grau i amb progressió en el temps (12,73), amb un risc estimat 2 cops superior de recurrència d'ictus en estenosis superiors al 70% (74) i fins a 7 vegades superior quan hi ha una progressió de l'estenosi. Aquest caràcter dinàmic de les estenosis sembla ser freqüent (entre el 32,5 i el 61% en 2 anys de seguiment (73,75), motiu pel qual la monitorització rutinària podria ser fins i tot més important que en l'aterosclerosi carotídia (26,73).

En la segona categoria estarien les diferències genètiques i/o interètniques, amb un major risc de recurrència en els pacients asiàtics i afroamericans com ja s'ha comentat anteriorment.

El pronòstic també varia en funció de la localització de l'estenosi responsable de l'ictus isquèmic:

En estenosis simptomàtiques de la porció intracranial de l'ACI o sífó carotídi, antigues series mostren un risc anual d'ictus entre el 8 i el 12% i una elevada mortalitat (43-50%) als quasi 3 anys de seguiment mig, essent el 55% dels òbits de causa cardíaca (76-78). Això podria indicar que les estenosis del sífó carotídi es comporten com un bon marcador d'aterosclerosi a nivell sistèmic. A més, aquestes series assenyalaven que la presència de lesions concomitant en la porció extracranial de l'ACI (lesions en tàndem) s'associava a un pitjor pronòstic (77,78).

En quant a les estenosis de l'ACM, l'estudi més extens sobre el seu pronòstic a llarg termini correspon als pacients inclosos en el braç mèdic d'un estudi de *by-pass* extra-intracranial (79). En aquest es va observar una taxa anual de recurrència del 7,8% en el territori distal a l'estenosi i del 9,5% en qualsevol territori vascular cerebral, amb una mortalitat anual significativament menor que la reportada per les estenosis de sífó carotídi (3,4%). En un estudi del nostre grup es van trobar taxes anual de recurrència similars (9.05% en el territori de l'estenosi i 10.2% en qualsevol territori cerebrovascular) i es va constatar que l'absència d'estenosis de l'ACI extracranial s'associava amb una menor progressió de les estenosis intracranials (73).

El sistema vertebrobasilar també posseeixen un alt risc de recurrència. En l'estudi *Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID)*, la taxa de recurrència anual en qualsevol territori vascular en pacients amb estenosis simptomàtica de l'AB, AV i ACP va ser del 15, 13.7% i 6% respectivament (80).

El tractament preventiu més adient en pacients amb MAIC simptomàtica no està encara definit. En primer lloc, els resultats de subestudis del WASID suggereixen que aquests pacients es poden beneficiar d'un maneig més agressiu dels FRCV (81). Així, contràriament a la creença clàssica, a més baixos foren els valors de pressió arterial durant el seguiment, menor va ser el risc de recurrència (82). No es pot en canvi afirmar que una reducció més agressiva del colesterol LDL sigui beneficiosa, ja que en estudis com el *Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels*, no evaluaren la localització del vas simptomàtic (83). i altres no han mostrat una millor evolució en els pacients amb estenosi asimptomàtiques de l'ACM tractats amb estatines (84).

En segon lloc, tot i que els pacients amb MAIC simptomàtica presenten una menor recurrència d'ictus amb tractament anticoagulant (71,73), l'estudi WASID prospectiu va

comprovar que aquest benefici no compensa la major taxa d'esdeveniments adversos hemorràgics i mortalitat de causa no vascular en els pacients tractats amb warfarina (70,71). Així doncs, d'acord amb aquests resultats, els antiagregants serien el tractament d'elecció per la profilaxis secundària dels pacients amb MAIC.

En aquest sentit, l'assaig *Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events* (CAPRIE) observà que els pacients amb història de malaltia ateroscleròtica simptomàtica es beneficiaven més del tractament amb clopidogrel que amb AAS, en línia amb els anàlisis que han mostrat que pacients d'alt risc, com ara aquells amb antecedent de cirurgia cardíaca o angina inestable, es beneficien d'un tractament antitrombòtic més potent (85-88). Igualment, un assaig multicèntric amb cilostazol va mostrar que la progressió de les estenosis era significativament menor en el grup de cilostazol més aspirina que en el de placebo més aspirina (89) i estudis recents han mostrat que un doble tractament antiagregant amb clopidogrel i aspirina és més efectiu que un tractament únic amb aspirina per reduir els senyals microembòlics causats per les estenosis intracrànials (90). Aquestes dos opcions terapèutiques en la MAIC han de ser investigades novament en assajos aleatoritzats adequadament dissenyats.

Finalment, els progressos continus en l'angioplàstia intraarterial i la col·locació de *stents* han comportat una milloria dels percentatge d'èxit d'aquestes tècniques (91). Alguns grups recomanen el tractament endovascular urgent en pacients amb ictus en els que ha fallat un òptim tractament mèdic o en estenosis severes i símptomes recents (92). L'angioplàstia pot tenir també la capacitat de reduir el risc d'ictus en poblacions seleccionades amb un risc anual d'ictus superiors al 3.36% (93,94). En tot cas, alguns estudis mostren que la col·locació de *stents* es pot realitzar amb èxit en l'ACM i que permet reduir les estenosis postoperació en comparació amb l'angioplastia (95-97). Tanmateix, els percentatges d'esdeveniments adversos varien àmpliament en les diferents sèries, la reestenosi intra-*stent* és freqüent i l'impacte en el pronòstic a llarg termini no està definit (29, 98).

Tot i el seu mal pronòstic, encara es desconeixen en gran part les peculiaritats de la història natural de la MAIC i cal més informació per discriminar els pacients de major risc. L'estudi de les vies moleculars involucrades en la fisiopatologia de la MAIC i la identificació de marcadors pronòstics, context en el que s'engloba la present tesi, pot ser important per seleccionar el tractament òptim d'una manera individualitzada.

Escales de risc:

La prevenció secundària d'esdeveniments cardiovasculars (CV) involucra intervenir en poblacions d'alt risc, identificades mitjançant instruments de predicció que integren informació sobre els FRCV com l'equació de Framingham, les taules del *Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE) o el *calibrated Framingham coronary risk* (REGICOR) (99,100,101).

Tot i que els models predictius han provat la seva utilitat en la cardiopatia isquèmica i la fibril·lació auricular i que algunes inclouen el risc d'ictus en pacients asimptomàtics (102), aquests models no són utilitzats habitualment en les decisions terapèutiques després d'un ictus isquèmic.

Varies escales predictives han estat proposades amb aquest propòsit i algunes han demostrat validesa externa per la predicció d'episodis cerebrovasculars recurrents (103-105):

El 1991 es va publicar el *Stroke Prognosis Instrument I* (SPI-I), una escala que estima la probabilitat als 2 anys d'ictus o mort en pacients amb AIT o ictus isquèmic no incapacitant. Aquesta escala assigna els pacients en 3 grups de risc en funció de 5 característiques clíniques amb un risc estimat del 10%, 21% i 59% respectivament (106).

A partir de l'SPI-I es va desenvolupar el *Stroke Prognostic Instrument II* (SPI-II) mitjançant la incorporació de noves variables (ictus previ i insuficiència cardíaca congestiva) identificades com a significatives en l'assaig *Women's Estrogen for Stroke Trial* (WEST) (103). Aquesta escala va ser validada en 3 cohorts independents, demostrant una distribució més uniforme dels pacients en els diferents grups de risc i una major distinció absoluta del risc entre els grups i AUC que el SPI-I (104).

Les escales SPI-I i SPI-II tenen però 2 limitacions: ometen l'etiologia del tipus d'ictus (gran vas, lacunar, embolic) i la presència de plaques aòrtiques, dues variables pronòstiques importants que no estaven disponibles l'assaig WEST. En segon lloc, només han estat provades en cohorts d'investigació i validades retrospectivament en cohorts hospitalàries, pel que no se sap si són extrapolables en poblacions fora d'aquest context.

L'escala predictiva de Hankey i col·laboradors, té la forma de 3 equacions que estimen la probabilitat de quedar lliure de diversos tipus d'esdeveniments CV (ictus; IAM i ictus, IAM o mort vascular) als 1 i 5 anys. Es va desenvolupar a partir de 469 pacients hospitalitzats amb un primer AIT o ictus menor i posteriorment es va validar en cohorts de població clínica (105,107). Tot i que aquesta escala té una AUC molt similar a la del SPI-II (0,65), resulta més difícil de calcular.

La escala *Life Long After Cerebral ischemia* (LiLAC) es basa en el *Dutch TIA Trial* i inclou 2457 pacients amb ictus de causa arterial amb un seguiment mig de 10 anys (108). Tot i que es basa en dades molt robustes de risc d'ictus o mort a llarg termini, encara no ha estat validada externament.

Posteriorment, es va publicar l'*Essen Stroke Risk Score* (ESRS), a partir d'una anàlisi retrospectiva de 6431 pacients inclosos en l'assaig CAPRIE, on va demostrar el seu valor pronòstic per ictus i esdeveniments CV majors en un any.

La ESRS ha estat la primera escala en ser validada en diversos estudis observacionals que inclouen tant pacients hospitalitzats com ambulatoris no seleccionats amb malaltia cerebrovascular recent o estable (109-112).

Aquesta és una escala de 10 punts (veure **Taula 2**) on les categories de baix risc (puntuació 0-2) i alt risc (puntuació ≥ 3) són fàcilment distingides. Cal aclarir que no inclou el risc associat a fibril·lació auricular (FA) ja que aquesta variable no va ser inclosa ni investigada en el seu desenvolupament. En tot cas, en altres estudis de seguiment la FA no ha estat identificada com un factor de risc independent per ictus recurrent en pacients anticoagulants (104,107). A més, l'ESRS ha estat validada posteriorment incloent pacients amb ictus cardioembòlics i es va comprovar que, tot i que l'exclusió d'aquest pacients podia millorar la seva capacitat predictiva, era aplicable en el total dels pacients (110).

Taula 2. *Essen Stroke Risk Score (ESRS).*

Factors de risc	Puntuació
<65 anys	0
65-75 anys	1
>75 anys	2
Hipertensió arterial	1
Diabetes mellitus	1
IAM previ	1
Malaltia arterial perifèrica	1
Altres malalties CV (excepte fibril·lació auricular)	1
Fumador	1
Altres ictus isquèmics o AIT a part de l'esdeveniment qualificador	1

IAM: infart agut de miocardi. CV: cardiovasculars

Finalment, Weimar i col·laboradors van comparar prospectivament les diverses escales (ESRS, Hankey, LiLAC i SPI-II) en una cohort de 1897 pacients amb AIT o ictus amb un seguiment mitjà d'un any (113). Aquests autors van trobar una discriminació similar entre elles en la predicció d'ictus i la combinació d'ictus i mort CV, amb una superioritat marginal en la SPI-II. A més, les taxes d'ictus o mort CV entre els diferents grups de risc en l'ESRS i SP-II es corresponien amb aquelles identificades en els estudis de validació (104,111), cosa que indicaria una bona transferibilitat a la població general. Tot i així, els valors predictius positius d'aquest marcadors són encara baixos i es pot qüestionar la seva utilitat.

Taula 3: Escales de risc validades per recurrència d'ictus (adaptada de Weimar et al, Stroke 2010 (113)).

Model pronòstic	ESRS	Hankey y cols.	LiLAC	SPI-II
Inclusió	Ictus isquèmic o AIT	AIT	AIT, ictus isquèmic menor	Ictus isquèmic o AIT
End point	Ictus isquèmic en 1-3 anys	Ictus en 1-10 anys	Ictus fatal o no fatal en 10 anys	Ictus o mort en 2 anys
Tipus de model	Escala de punts	Model de regressió de Cox	Model de regressió de Cox	Escala de punts
Edat	65-75=1; >75=2	$\beta=0.0452$	HR=1.03	>70=2
Sexe masculí		$\beta=0.3600$	HR=1.030	
Hipertensió arterial	1			1
Diabetis mellitus	1		HR=2.05	3
Fumador	1			
AIT previ	1	Cada AIT en els últims 3 mesos: $\beta=0.0158$		
Ictus previ				3
AIT carotidi i vertebrobasilar		$\beta=0.5265$		
Malaltia arterial perifèrica	1	$\beta=0.7568$	HR=1.62	
IAM previ	1			
Malaltia CV excloent IAM	1			
Malaltia coronària				1
Insuficiència cardíaca				3
Hipertrofia ventricular esquerra (electrocardiograma)		$\beta=0.6805$		
Esdeveniment índex, ictus vs. AIT		$\beta=0.7389$	HR=1.52	2
AIT cerebral (vs. amaurosis fugax)		$\beta=0.7179$		
Paresia			HR=1.27	
Disàrtria			HR=1.26	
Estratificació de risc:				
Grup de baix risc	0-2			0-3
Grup de mig risc				4-7
Grup d'alt risc	3-9			8-15

HS: hazard ratio; IAM: infart agut de miocardi; CV: cardiovascular.

En assajos de prevenció secundària s'ha definit un alt risc de recurrència d'ictus com a aquell superior al 4% anual, la qual cosa es correspon a un ESRS>3 en els estudis prospectius de validació en pacients ambulatoris estables (111).

En el quart article de la present tesi (article annex), es va aplicar l'escala ESRS a la cohort a estudi pel seu bon perfil de cara a la pràctica clínica i per no disposar d'algunes de les dades requerides en altres escales (insuficiència cardíaca en la SPI-II; signes electrocardiogràfics d'hipertrofia ventricular i amaurosis fugaç en l'escala de Hakey; o símptomes de parèsia o disàrtria en l'ictus en l'escala de LiLAC).

1.1.4. Paper de l'índex turmell-braç (ITB) en la malaltia ateroscleròtica

L'ITB és una eina diagnòstica emprada per a l'avaluació de la circulació arterial en les extremitats inferiors. Aquest paràmetre compara la pressió sistòlica mesurada per Doppler continu de les artèries dels turmells (tibials anteriors (a través de l'artèria pèdia) i posteriors) amb la de les artèries braquials. Un ITB inferior a 0.9 és altament sensible i específic de malaltia arterial perifèrica (MAP) diagnosticada angiogràficament (114) i el grau de disminució de l'ITB està correlaciona amb la gravetat de la MAP (115).

La malaltia ateroscleròtica en diferents territoris vasculars es relaciona amb esdeveniments clínics en altres territoris (116). En aquest sentit, la MAP s'associa amb un major risc d'IAM i ictus (110,117-119) i és per això que guies com la de l'*American Heart Association* (AHA) recomanen l'ABI per identificar pacients asimptomàtics amb un major risc CV (110).

En múltiples estudis publicats, un ITB patològic s'ha relacionat de manera independent amb malaltia ateroscleròtica carotídia (120), MAIC (119,121) i risc de nous episodis vasculars després d'un ictus (110,118,119). Per contra, alguns estudis també han observat una escassa o en ocasions nul·la capacitat pronòstica de l'ITB patològic al ajustar pels FRCV (116,121).

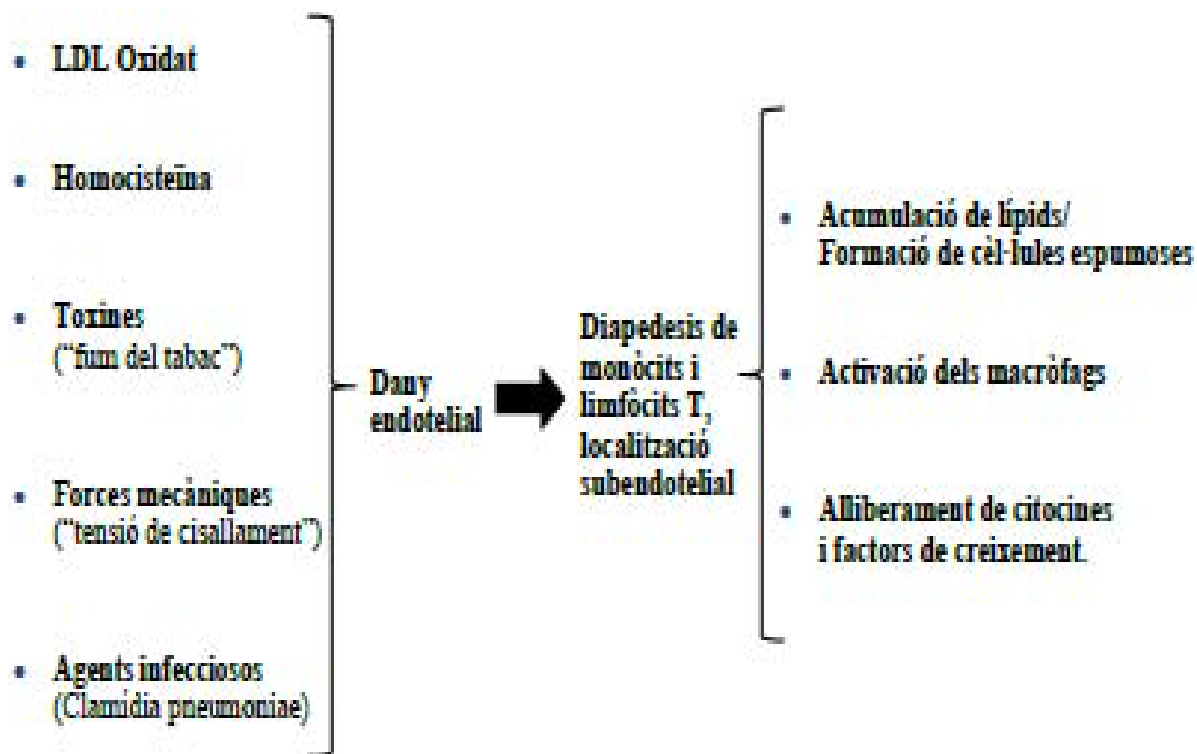
Cap estudi ha avaluat però la relació de l'ITB amb la recurrència d'ictus en una cohort composta exclusivament per pacients amb ictus provocat per MAIC.

1.2. L'aterosclerosi, una malaltia inflamatòria crònica

El paper de la inflamació en l'aterosclerosi i l'ictus ha rebut una creixent atenció en les últimes dècades. El concepte però és antic; de fet, Virchow ja discutia sobre la importància de la inflamació de les arteries el 1847 (122). Posteriorment, i fins les últimes 2 dècades, les investigacions es van centrar però en el paper del colesterol en la patogènesi de l'aterosclerosi.

Segons la teoria reconeguda actualment, desenvolupada per Russell Ross i altres investigadors (123), l'aterosclerosi es considera una malaltia predominantment inflamatòria produïda per una “resposta a la lesió” (veure **Figura 4**). Múltiples estímuls tòxics, com el LDL oxidat, la homocisteïna i els tòxics del tabac; contribueixen al dany endotelial i la conseqüent cascada d'esdeveniments mediats immunològicament. Primer es produeix una adhesió de monòcits i limfòcits a la superfície endotelial i posteriorment la migració subendotelial d'aquestes cèl·lules. Els macròfags llavors, adquireixen lípids, transformant-se en cèl·lules espumoses i, juntament amb altres macròfags, alliberen citocines i factors de creixement. Això porta a la proliferació de les cèl·lules del múscul llis i a la formació de d'un placa fibrosa. La funció de la inflamació en el procés ateroscleròtic pot ser posteriorment dividida en 3 fases: l'aterosclerosi de desenvolupament precoç, la progressió de la placa ateroscleròtica i la ruptura sobtada de la placa. Els macròfags derivats dels monòcits i també els limfòcits T, han estat trobats en humans en talls d'aterosclerosi en l'etapa més precoç del procés patològic (124,125), indicant que la inflamació juga un paper iniciador en el desenvolupament de la lesió. Tot i que l'objectiu inicial de la resposta immune, amb l'acumulació de LDL oxidat pels monòcits, és contenir l'exposició tòxica i prevenir la lesió de l'endoteli, l'activació dels macròfags acaba propagant la inflamació mitjançant l'alliberament de citosines (incloent varies interleuquines, interferons, factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α)) i diversos factors de creixement (126).

Figura 4. Hipòtesi de l'aterosclerosi com a resposta a la lesió (adaptat de Ross et al, N Engl J Med. 1999 (123)).



Mentre aquest procés continua, hi ha un increment de les cèl·lules inflamatòries en l'ateroma, per reclutament des de la sang i per multiplicació dins la mateixa lesió. Les integrines derivades de l'endoteli, provoquen l'adherència dels monòcits i cèl·lules T, particularment en els punts de ramificació de les artèries, on les turbulències de la sang són més prominents (127,128) i la tensió de cisallament porta a una sobrerregulació dels gens productors d'aquestes integrines (129,130).

La ruptura de la placa, el precipitant agut d'aproximadament el 50% dels episodis clínics relacionats amb l'aterosclerosi de gran vas, també es relaciona amb mecanismes inflamatoris. La ruptura té lloc en les parts de la placa amb un alt contingut de macròfags (131) i pot ser afavorida per la destrucció de la capa fibrosa a través de la sobrerregulació i producció d'enzims proteolítics, incloent metal·loproteïnases i col·lagenases derivades de macròfags estimulats per cèl·lules T activades (132,133). Alguns perfils inflamatoris de placa poden correlacionar-se amb una major propensió a la inestabilitat. Així per exemple, plaques de pacients amb angina inestable mostren un

contingut més gran de P-selectina (134) i altres citocines i el perfil de citocines sistèmiques varia entre les poblacions amb angina estable i inestable (135). Això es constata també en la malaltia cerebrovascular, on nivells elevats de macròfags, cèl·lules T (136), molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1) i TNF- α (137,138) s'han trobat en major proporció en mostres d'endoarteriectomia de pacients simptomàtics. Tot i que els mecanismes precisos mitjançant els quals aquestes molècules causen l'aterosclerosi és encara incert, hi ha consens en que juguen un paper important.

Des d'un punt de vista clínic, entendre la funció central de la inflamació en la malaltia ateroscleròtica ha portat a una nova fase en la detecció i tractament dels pacients de risc. El més conegut dels marcadors d'inflamació és la PCR, però altres marcadors, incloent els leucòcits, l'IL-6, el CD40L, l'ICAM-1, l'E-selectina o l'amiloide A sèric (SAA), poden també predir episodis isquèmics. Increments relatius en els seus nivells, fins i tot dins del rang normal, poden servir com a predictors de risc de futurs esdeveniments.

Taula 4. Marcadors d'inflamació que han estat associats amb esdeveniments cardíacs i ictus isquèmic (adaptat d'Elkind, Neurologist 2006(139)).

Reactants de fase aguda	Citocines	Molècules d'adhesió solubles	Altres
PCR	IL-1 β	E-selectina	Leucòcits
hs-PCR	IL-2	P-selectina	Plaquetes
SAA	IL-6	ICAM-1	VSG
Fibrinogen	IL-8	VCAM-1	Mieloperoxidasa
Haptoglobina	IL-10	Lligant CD40	
	TNF α		
	Receptor del TNF		

PCR = proteïna C reactiva; hs-PCR = proteïna C reactiva d'alta sensibilitat; SAA = amiloide A sèric; IL = interleuquina; TNF = factor de necrosi tumoral; ICAM = molècula d'adhesió intercel·lular 1; VCAM-1 = molècula 1 d'adhesió de cèl·lules vasculares; VSG = velocitat de sedimentació globular

L'any 2001 es va publicar la definició oficial de marcador biològic o biomarcador: és aquella característica que pot ser mesurada de forma objectiva i avaluada com a indicador de processos biològics normals, processos patològics o respostes a una intervenció terapèutica farmacològica (140). Els biomarcadors que ens ajudin a

determinar la causa, el pronòstic o el tractament en pacients amb malaltia cerebrovascular serien de gran utilitat en la pràctica clínica (141).

El coneixement de la fisiopatologia de cada tipus d'ictus és essencial per tal d'identificar les molècules que poden funcionar com a biomarcadors. Tanmateix, tot i el gran nombre d'estudis realitzats, encara ens trobem amb resultats preliminars que dificulten el seu ús de forma generalitzada (142).

1.2.1. Proteïna C reactiva (hs-PCR) i aterosclerosi.

Les proteïnes de fase aguda han estat els marcadors d'inflamació més extensament estudiats. La PCR, en concret, té moltes característiques que la fan recomanable com a marcador molecular de risc associat amb la inflamació.

La PCR és una proteïna plasmàtica que pertany a la família de les pentraxines i que és produïda pel fetge, així com també per les cèl·lules musculars llises i els adipòcits, en resposta a l'estimulació per l'IL-6. Forma part de la resposta immune innata i és capaç de realitzar varies accions immunològiques que poden contribuir al procés inflamatori crònic que contribueix a l'aterosclerosi. Les avantatges que presenta la determinació de la PCR són que és una proteïna estable, que no es veu molt afectada pels cicles de congelació i descongelació, té una llarga vida mitja, una baixa variació diürna i la seva mesura no precisa de dejú. La principal desavantatge que té és que és molt inespecífica, podent incrementar-se substancialment en infeccions agudes o altres malalties que estimulin la inflamació.

Els mecanismes pels que la PCR pot estar associada amb l'ictus continuen essent incerts. La PCR pot ser un "epifenomen", o marcador d'inflamació present en l'aterosclerosi, sense ser directament responsable d'ella. Alternativament, una creixent evidència suggereix que la PCR pot jugar un paper causal directe i ser un factor de risc per l'aterosclerosi. In vitro, la PCR estimula l'alliberació de varies citocines i factors de creixement, alt temps que regula a la baixa l'òxid nítric (ON), un potent vasodilatador (143). Altres evidències suggereix que reajustaments en la conformació en la PCR poden ser requerits perquè desenvolupi les seves accions pro-inflamatòries, la qual cosa recolzaria també la seva acció directe en el procés (144).

La concentració de PCR en sang prediu la progressió de l'aterosclerosi subclínica (145-147) i sembla tenir una major implicació en la transició de la malaltia subclínica a clínica, de manera que es considera a la PCR com un marcadors d'activitat inflamatòria en l'interior de la placa. D'acord amb això, en pacients als que es va practicar un *bypass* coronari, s'observà una relació directa entre la concentració d'aquesta proteïna i el grau de ruptura de la placa (148) i els nivells de PCR van predir el risc d'ictus en el *Cardiovascular Health Study* independentment de l'índex íntima-mitja (IMT) (149). Respecte l'aterosclerosi subclínica, la PCR s'associa a la presència de lesions (150), però no de forma consistent amb l'extensió i gravetat de les mateixes (145,151,152). Per tant, la PCR es comportaria com un marcador de la dinàmica de l'aterosclerosi més que com un marcador de la seva extensió i gravetat. (adaptat d'Arenillas, Tesis doctoral 2003(17))

1.2.1.1. La hs-PCR com a factor pronòstic.

La PCR ha demostrat ser predictora d'esdeveniments CV incidents en varies poblacions (153). En el Women's Health Study, la PCR, IL-6 i l'ICAM-1 van predir la incidència esdeveniments CV, incloent l'ictus (154,155). A més, models multivariats mostraren que la PCR era l'únic marcador inflamatori que predeïa independentment aquest risc i la seva inclusió millorava notablement l'habilitat predictiva de models que contenen valors de lípids i altres FRCV (154,156). Una limitació important d'aquests estudis però, és que es centraven en individus sans de mitjana edat sense una carga significativa de FRCV.

La PCR està associada a FRCV com l'edat, tabac, pressió arterial, obesitat, dieta, SMet i consum d'alcohol (157). A més, està associada amb infecció per *H. pylori*, *C. Pneumoniae*, periodontitis i altres en general. En moltes anàlisis estadístiques tenint en compte aquests factors de risc però, la PCR s'ha mantingut com a factor de risc independent per malaltia CV (158).

La relació de la PCR amb el risc d'ictus incident és menys segura que la seva relació amb l'IAM. Els nivells de $PCR \geq 2.1 \text{ mg/l}$ eren predictor independent d'un primer ictus isquèmic (risc relatiu 1.9 per aquells amb $PCR \geq 2.1 \text{ mg/L}$) en el *Physicians' Health Study* (153). En un altra estudi entre individus de més de 85 anys, la PCR s'associava amb un risc incrementat d'ictus fatal i de mort (159). En l'estudi Framingham, homes en el quartil més alt de PCR tenien el doble de risc d'ictus que aquells en el més baix i les

dones tenien 3 cops més risc (160). Pels homes però, l'increment de risc no era estadísticament significatiu després d'ajustar pels FRCV. En tot cas els subtipus d'ictus estaven caracteritzats de forma incompleta en aquests estudis. De manera similar, els nivells basals de PCR en homes sans d'origen japonès es va associar amb un risc incrementat d'ictus als 10-15 anys de seguiment (161), mentre que no es van trobar associacions significatives entre aquells de més de 55 anys, amb hipertensió o diabetis. El major valor predictiu de la PCR doncs pot trobar-se en els individus amb un risc basal més baix. Això pot explicar perquè l'associació entre PCR i ictus s'atenua en poblacions de més edat i en aquells amb més FRCV.

En quant a la recurrència d'ictus, les guies recomanen determinar la PCR després d'un interval de varies setmanes després de l'ictus per obtenir una mesura més estable. És també raonable mesurar el valor 2 cops en un interval de 2 setmanes (157). En tot cas, nivells de PCR superiors a 10 mg/L dins les 72 hores posteriors a l'ictus van predir un increment de mortalitat en un període de més de 4 anys (162). Altres estudis trobaren que nivells de PCR superiors a 15 mg/L en el moment de l'alta s'associaven a nous episodis vasculars o mort (163) o que, en aquells amb nivells de PCR > 14.1 mg/L al menys 3 mesos després d'un primer episodi cerebrovascular, hi havia un risc incrementat de recurrència d'ictus o IAM a l'any (164).

En la conferència de consens de l'American Heart Association (AHA/Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) sobre marcadors inflamatoris del 2002, es va determinar que la mesura de la inflamació, i específicament de la PCR, té un paper en la prevenció primària d'esdeveniments CV; particularment en pacients considerats en un risc mig. En aquests pacients la elevació en la PCR pot aportar la informació addicional per justificar iniciar un tractament amb estatines, per exemple, o un estudi diagnòstic més intensiu per malaltia CV (99,165) (veure **Taula 5**). Tanmateix les guies encara no han establert formalment aquesta recomanació.

Taula 5. Temps per la mesura i nivells normatius recomanats de la PCR en pacients de risc vascular entremig (adaptat de Pearson et al, Circulation 2003(157)).

Ús de la hs-PCR en la prevenció primària
1. El mesurament de la hs-PCR s'hauria de realitzar en dos ocasions separades en 2 setmanes
2. Els pacients poden estar o no en dejú
3. S'hauria de fer una mitjana dels resultats
4. Si els nivells de la hs-PCR són >10 mg/L: a. El pacient hauria de ser examinat per signes d'infecció i inflamació b. El test s'hauria de repetir
5. Categorització del nivell de risc del pacient (l'alt risc indica el doble de risc que el baix risc) a. hs-PCR < 1 mg/L: Baix b. hs-PCR 1-3 mg/L: Intermedi c. hs-PCR >3 mg/L: Alt (considerar tractament amb estatines, etc.)

En tot cas, la decisió de mesurar la PCR en pacients amb ictus pot basar-se en les guies de la CDC/AHA fins que no hi hagi més dades disponibles. Ja que les guies de prevenció secundària d'ictus no estableixen que tots els pacients hagin de ser tractats amb estatines (166), la PCR pot ser utilitzada com un marcador addicional per ajudar a determinar en quin pacient haurien de ser prescrites (157). En l'assaig randomitzat controlat JUPITER, en el qual individus sans eren enrolats en base a un valor de PCR >2 mg/L i una concentració de colesterol LDL <130 mg/dL, la rosuvastatina reduïa el risc d'esdeveniments CV, incloent ictus, portant a proposar que un punt de tall de PCR de 2 mg/L podria utilitzar-se com a llindar per facilitar la prescripció d'estatines per la prevenció primària de malaltia vascular (167). En un futur, la mesura de la PCR i altres biomarcadors podria ajudar també a decidir quan iniciar altres teràpies. En aquest sentit, s'ha observat que dosis baixes de metotrexat disminueixen els paràmetres d'inflamació sistèmica, incloent la VSG i la PCR (168,169), i les morts CV es redueixen fins un 70% en els pacients amb artritis reumatoide tractats amb metotrexat (170).

Cal tenir en compte però, que hi ha constància que les concentracions de PCR varien entre poblacions de diferents ascendència i que el tipus d'ètnia pot influir alhora d'escollir un tractament amb estatines basat en els valors de tall de PCR (171-173). Així, per exemple, 2 estudis en individus japonesos reportaven associacions relatives semblants de PCR amb el risc coronari a les observades en Europeus, però amb valors absoluts més baixos (174,175).

Igualment, degut a la heterogeneïtat de les causes d'ictus, la mesura de la PCR podria ser especialment útil en determinats tipus d'ictus. En aquest sentit, s'han trobat nivells de PCR significativament més alts en individus amb estenosis carotídiades extracranials que amb MAIC (16,64,176).

1.2.1.2. Paper dels polimorfismes de la PCR:

Un polimorfisme és una variació en la seqüència d'un lloc determinat de l'ADN entre els individus d'una població. Un polimorfisme pot consistir en la substitució d'una simple base nitrogenada (polimorfismes de nucleòtid únic (SNP)); per exemple, la substitució d'una citosina (C) per una timina (T), o pot ser més complicat; per exemple, la repetició d'una seqüència determinada d'ADN. Aquells polimorfismes que afecten la seqüència codificant o reguladora i que produeixen canvis importants en l'estructura de la proteïna o en el mecanisme de regulació de la seva expressió, poden traduir-se en diferents fenotips. Els canvis poc freqüents en la seqüència de bases de l'ADN no es diuen polimorfismes sinó mutacions. Perquè es pugui considerar un polimorfisme, la variació ha d'aparèixer en almenys l'1% de la població.

Tot i que les concentracions de la PCR tenen una gran varietat interindividual a causa de factors ambientals, sociodemogràfics, conductuals i d'estil de vida, com la obesitat i la diabetis tipus II (177,178), estudis familiars en bessons han portat a estimar que els factors genètics contribueixen fins en un 35%-50% a la variació fenotípica de les concentracions de la PCR en sang (179,180). Polimorfismes comuns del gen de la PCR en pacients amb malaltia CV poden explicar les variacions en els nivells de la PCR plasmàtica i la predisposició a desenvolupar una malaltia cerebrovascular. El 2005, Miller i col·laboradors (181) van seqüenciar el gen de la PCR en pacients de tres assajos diferents. Quatre al·lels menors (-757T>C, IVS1+29A>T, 1444C>T i -286C>T>A) del gen de la PCR s'associaren amb nivells més alts de PCR, mentre que dos al·lels menors

(1059G>C and 1846G>A) s'associaren amb nivells més baixos. Cap d'aquests SNP s'associaren però amb el risc de partir un IAM o un ictus.

El 2006, un estudi de Lange i col·laboradors (182) es va proposar respondre si hi ha una associació entre SNP del gen de la PCR i el risc d'esdeveniments CV. Els seus resultats indicaren que l'al·lel 790T s'associa a un increment del risc d'IAM en afroamericans, l'al·lel 1919 T a un risc incrementat d'ictus i mortalitat CV en caucàsics i els al·lels menors dels SNP 2667 i 3872 amb un risc disminuït de mortalitat CV en caucàsics. Les direccions del risc CV en aquests casos foren consistents amb les concentracions plasmàtiques de PCR. Això suggerí que la PCR està implicada causalment amb l'aterosclerosi i que els al·lels associats amb nivells alts d'aquesta proteïna confereixen un risc incrementat de malaltia CV.

Aquestes associacions genotip/haplotip-fenotip es recolzen en dades funcionals dels polimorfismes dins de la regió promotora de la PCR: l'haplotip promotor comú, etiquetat per l'al·lel 790 T, es trobà associat a un activitat transcripcional basal incrementada en hepatòcits humans in vitro (183,184). A més, l'al·lel 790 T i l'al·lel 1919 T (localitzat dins del primer intró), els quals es caracteritzen per un altre polimorfisme promotor comú en el lloc 1440, estan relacionats amb haplotips altament actius (183).

Tot i relacionar-se amb la malaltia CV clínica, no hi ha evidència d'associació entre aquestes variants dels gens de la PCR amb indicadors d'aterosclerosi subclínica, com l'IMT. Això seria consistent amb la manca d'associació dels nivells de PCR en sang amb l'IMT (171,185) i el paper predominant de la PCR en la inestabilització de la placa, més que en la progressió de l'aterosclerosi (148,186).

Per altra banda, s'ha observat que els genotips contribuïen en menys del 2% a la variació interindividual en les concentracions plasmàtiques de PCR i que les raons de risc per malaltia CV segons els genotips només s'atenuen lleument al ajustar per les concentracions plasmàtiques de la proteïna. Si l'associació entre malaltia CV i genotip de PCR fos purament per la influència dels gens en les concentracions de PCR, esperaríem que aquesta atenuació fos més pronunciada (182). Podria ser doncs que tant les concentracions de PCR com el genotip de la PCR estiguin independentment associats amb la malaltia CV clínica. A més, si la inflamació crònica juga una funció

causal en el desenvolupament d'aquesta malaltia, la PCR plasmàtica mesurada en un sol moment pot no reflectir adequadament el dany inflamatori acumulat (187,188).

En aquest sentit, el primer article d'aquesta tesi explora la relació del polimorfisme C1444T de la PCR amb els nivells en sang de la proteïna i la recurrència d'episodis isquèmics en pacients d'alt risc CV per MAIC simptomàtica.

1.2.2. Aterosclerosi i altres marcadors d'inflamació (Lp-PLA2, E-selectina, ICAM-1) i d'inhibició de la fibrinòlisis (PAI-1).

1.2.2.1. Lipoproteïna-associada a fosfolipasa A2 (Lp-PLA2):

La Lp-PLA2, també coneguda com acetilhidrolasa del factor activador de plaquetes (FAP), es una serin lipasa calci-independent que pertany a la superfamília de les fosfolipasas A2. Aquests enzims es caracteritzen per la seva capacitat de catalitzar la hidròlisis de la cadena ester central (sn-2) dels fosfolípids, entre els quals es troba la FAP. La Lp-PLA2 és produïda per en les cèl·lules inflamatòries circulants (macròfags, monòcits, mastòcits), en les plaquetes i en la íntima vascular (189,190). El 70-80% de la Lp-PLA2 circulant es troba unida a la apolipoproteïna B del colesterol LDL, mentre que el 15-20% es transporta unida a la HDL i la resta a la VLDL.

La FAP és un fosfolípid secretat pels macròfags, neutròfils i plaquetes que facilita l'agregació i degranulació de les plaquetes, un procés que es considera important en la fisiopatologia dels síndromes coronaris aguts (191).

Inicialment es va suggerir que la Lp-LA2 podia tenir una funció protectora en l'aterosclerosi basant-se en el seu paper en la degradació de la FAP i dels fosfolípids oxidats de la LDL (192,193). Aquesta teoria però no s'ha corroborat, ja que la degradació del FAP per la Lp-PLA2 no s'ha demostrat *in vivo* i, a més, s'ha vist que certs fosfolípids oxidats poden tenir un paper antiinflamatori (194,195). En canvi, actualment es considera clarament definit el paper proaterogènic de la Lp-PLA2.

Aquesta funció proaterogènica s'inicia amb la oxidació de la LDL dins de la capa íntima la qual cosa comporta la modificació de la posició sn-2 dels fosfolípids continguts dins de la LDL, fent-los susceptibles a hidròlisis per la Lp-PLA2. La hidròlisis d'aquests fosfolípids dona lloc a la formació de dos mediadors biològicament actius: la lisofosfatidilcolina (LysoPC) i els àcids grassos oxidats no esterificats (NEFA). La

LysoPC i els NEFA tenen un paper proinflamatori incrementant l'expressió de les molècules d'adhesió, activant els leucòcits (196) i reclutant macròfags i monòcits a la placa ateroscleròtica (197). Les cèl·lules inflamatòries en la placa ateroscleròtica produeixen llavors més Lp-PLA2, conclouent un cicle d'auto-inducció i progressió de l'ateroma (196). La Lp-PLA2 es trobaria doncs en l'encreuament de camins entre el metabolisme lipídic i la resposta inflamatòria.

Els nivells de Lp-PLA2, a diferència dels de PCR, han demostrat ser estables inter i intra-individualment i no alterar-se en el context infeccions sistèmiques i altres estímuls inflamatoris (198). Aquesta escassa variabilitat biològica afegida a l'aparent especificitat de la Lp-PLA2 per la inflamació vascular, la converteixen en un valuós marcador per la detecció i monitorització del risc CV (199). A més, els nivells de la Lp-PLA2 semblen ser independents dels de la PCR circulant (200,201). La Lp-PLA2 pot estimar-se mitjançant la mesura de seva massa total o bé de la seva activitat enzimàtica en sang, presentant ambdues una bona correlació en la majoria dels casos. La concentració de la Lp-PLA2 es correlaciona amb els nivells de colesterol total i LDL. Igualment, s'ha vist que la Lp-PLA2 s'incrementa en relació amb l'edat, tabac, SMet, sexe masculí (degut al paper dels estrògens en les dones) i en l'ètnia caucàsica (202-206) Per altra banda, s'ha trobat una correlació negativa entre els nivells de la Lp-PLA2, els de colesterol HDL i el consum d'alcohol.

El paper de la massa de la PLA2, determinada mitjançant el test utilitzat en el segon article d'aquesta tesi (diaDexus PLAC Test), es va avaluar en 1348 mostres de l'estudi l'*Atherosclerosis Risk in Communities Study* (ARIC) i 741 controls. En l'anàlisi multivariant ajustat per altres factors pronòstic, es va comprovar que els tercils alts i entremitjos de Lp-PLA2 eren predictors de cardiopatia isquèmica. A més, al haver-hi una interacció entre la Lp-PLA2 i el colesterol LDL, es va avaluar la proporció de risc associat a la Lp-PLA2 en els subgrups amb colesterol LDL per sobre del valor mitjà de la població cohort. En aquest subgrup amb LDL alt, es va observar que els tercils mig i alt tenien uns valors de Lp-PLA2 superiors (350 i 460 ng/mL respectivament) però que el risc era també més alt en els pacients en el tercil alt de Lp-PLA2. En tot cas, en individus amb nivells elevats de LDL s'hauria de considerar un punt de tall més alt de Lp-PLA2 (204).

En tot cas, els intervals de referència de la massa de Lp-PLA2 (90% central) a partir de mostres poblacionals incloent múltiples ètnies, són de 120 a 342 ng/mL en dones i de

131 a 376 ng/mL en homes. Aquests intervals serveixen només de guia i caldria que cada laboratori establis els seus propis valors de referència. En tot cas, molts estudis han demostrat un risc incrementat de malaltia CV associat a valors de Lp-PLA2 en el segon i tercer tercil (67% més alt) (204,207-209). Tenint en compte això, una aproximació conservadora per identificar individus amb un risc CV incrementat, podria utilitzar el valor del percentil 50 que correspondria a 235 ng/mL (210).

L'estudi ARIC es va re-analitzar posteriorment per determinar el risc d'ictus. Es van identificar un total de 223 ictus, dels quals el 87% eren ictus isquèmics associats amb aterosclerosi, una proporció similar a la estimada per la població general (211). Els resultats van demostrar que la Lp-PLA2 era un fort predictor d'ictus, un cop ajustat el model pels FRCV i la PCR (201). No es va observar una diferència significativa dels nivells de LDL en els pacients amb ictus respecte a la resta; tampoc una correlació entre els nivells de Lp-PLA2 i de PCR però en canvi sí un efecte additiu, assolint un risc relatiu d'11 els individus amb nivells elevats d'ambdós biomarcadors. A més els nivells de triglicèrids i colesterol no mostraren una associació significativa amb el risc d'ictus. Es va suggerir per tant, que la reducció del risc d'ictus observada en els pacients tractats amb estatines en estudis com el *Heart Protection Study*, podria deure's a la disminució de la Lp-PLA2 associada a la reducció dels nivells del colesterol LDL, de manera que aquest enzim es podria convertir en un objectiu terapèutic independent dels nivells lipídics (201). A més, la Lp-PLA2 i la PCR podrien oferir informació complementària, ja que la primera ha demostrat ser un fort predictor de recurrència d'ictus mentre que la PCR s'associa més amb la mortalitat i amb la gravetat del nou ictus (212).

En dones post menopàusiques, Wassertheil-Smoller i col·laboradors van trobar una associació entre Lp-PLA2 i la incidència d'ictus només en el subgrup que no rebia tractament hormonal substitutiu. Tampoc es va detectar associació entre la Lp-PLA2 i el risc d'esdeveniments CV en dones sanes de mitjana edat, tot i que sí que es relacionava amb els nivells de PCR. Així doncs, la Lp-PLA2 no sembla ser un factor de predicció en dones no seleccionades (213).

Respecte a l'activitat de la Lp-PLA2, en un estudi en 1820 individus d'edat superior o igual a 55 anys derivat del *Rotterdam Study* (200), els nivells elevats d'activitat Lp-PLA2 es van associar també a un major risc tant de cardiopatia com d'ictus isquèmic independentment dels nivells de PCR i els nivells de colesterol. A més, l'activitat Lp-

PLA2 s'ha associat amb la presència d'aterosclerosi subclínica tot i que de perden la seva significació al ajustar pels nivells de colesterol (214,215).

En quant a la recurrència d'ictus, en l'estudi *Northern Manhattan Stroke*, els pacients en el quartil més alt d'activitat de Lp-PLA2 tenien un risc 2.5 vegades major de recurrència que els del quartil més baix. Aquest risc era encara major en els pacients amb ictus d'etiologia ateroscleròtica i en canvi, no es constatava en els pacients amb nivells de LDL ≥ 130 mg/dL. Així doncs, es confirmaria també una interacció entre l'activitat de la Lp-PLA2 i el LDL que diluiria el seu valor predictiu (216).

Finalment, per consolidar les dades publicades es va realitzar un meta-anàlisi dels estudis més rellevants. Es van analitzar 79.036 participants de 32 estudis prospectius combinant-se les dades d'esdeveniments CV primaris i recorrents. Per cada desviació estàndard d'increment d'activitat i massa de Lp-PLA2, el risc relatiu d'ictus ajustat pels FRCV era de 1.08 i 1.14 respectivament i el de mortalitat vascular de 1.16 i 1.13. Es va concloure a més que el risc CV atribuït a la Lp-PLA2 podria ser tant rellevant com l'atribuït als FRCV (217).

El test estàndard per determinar la massa de la Lp-PLA2 ha estat aprovat per la US Food and Drug Administration i està comercialitzat (198). Tot i que no està recomanat per *screening* rutinari, el seu ús pot millorar la valoració dels pacients amb un risc moderat o alt de malaltia CV segons els FRCV clàssics (veure **taula 6**). S'ha suggerit que els pacients amb nivells elevats de Lp-PLA2 podrien beneficiar-se d'un tractament intensiu amb agents modificadors dels lípids per assolir una LDL 30 mg/L inferior a l'objectiu recomanat normalment. En els pacients que han assolit nivells òptims d'LDL però mantenen una Lp-PLA2 elevada tot i el tractament amb estatines, podria estar indicat un tractament combinat amb modificadors dels lípids per optimitzar els nivells d'HDL i triglicèrids (218).

Taula 6. Criteris simplificats per identificar els pacients amb com a mínim un risc moderat de malaltia CV² (adaptat de Davidson et al., Am J Cardiol 2008 (218)).

Qualsevol edat amb 2 factors de risc ¹
Edat ≥65 anys ²
Fumador
Nivells de glucosa en dejú ≥100mg/Dl
Síndrome metabòlic

1 Fumador, hipertensió, història familiar de malaltia coronària prematura, nivells baixos de colesterol HDL (<40 mg/dL en homes, <50 mg/dL en dones)

2 Un pacients amb ≥1 dels criteris té un risc moderat per malaltia cardiovascular (CV)

Aquest interessant biomarcador no ha estat avaluat en pacients amb ictus secundari a MAIC, els quals suposen una cohort de molt alt risc. Per aquest motiu, en el segon treball d'aquesta tesi s'estudia l'impacte pronòstic d'aquest enzim en la MAIC.

1.2.2.2. Molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina i ICAM-1):

Les cèl·lules endotelials, al ser estimulades per citocines com el TNF- α o l'IL-1, expressen molècules d'adhesió en la seva superfície que faciliten l'adhesió i activació dels leucòcits com a pas previ a la seva migració transendotelial. Per aquest motiu, la quantificació de les isoformes solubles de les molècules d'adhesió en sang aporta informació sobre la inflamació endotelial *in vivo*.

La molècula d'adhesió endoteli-leucòcit 1 (ELAM-1, també coneguda com E-selectina) s'uneix a un conjunt d'estructures carbohidrat en la superfície dels leucòcits. La molècula d'adhesió de cèl·lules vasculares (VCAM-1) i la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1), membres de la superfamília de les immunoglobulines, interactuen amb integrines de la superfície dels leucòcits. L'E-selectina i la VCAM-1 s'expressen exclusivament en les cèl·lules endotelials, mentre que l'ICAM-1 pot ser expressada també pels leucòcits, fibroblasts i cèl·lules epitelials (219,220).

La sobrerregulació de les molècules d'adhesió s'ha observat en l'aterosclerosi de les arteries coronàries (221) i carotídiades (137,222-224), i un increment de les seves isoformes solubles en sang s'ha associat amb el risc d'esdeveniments CV, incloent l'ictus (155,225).

Un estudi en pacients amb malaltia cerebrovascular de gran vas i encefalopatia microangiopàtica, va observar que l'alliberament d'aquestes molècules estava incrementat de forma similar en ambdues malalties (226). La causa de l'activació inflamatòria endotelial en pacients amb malaltia ateroscleròtica de gran vas podria deure's a la irritació crònica de l'endoteli provocada pels FRCV convencionals. En l'estudi anteriorment mencionat, es va trobar una relació entre els nivells d'E-selectina i ICAM-1 solubles amb l'hàbit tabàquic, tot i que no amb altres FRCV. Altres factors que podrien contribuir a aquesta activació endotelial són l'estrès de cisallament hemodinàmic (127), la LDL (227) o les infeccions cròniques de la vasculatura (228,229). Per contra, l'activitat antiinflamatòria de l'àcid acetilsalicílic podria reduir l'expressió i alliberament d'aquestes molècules d'adhesió.

A més, altres estudis han observat que la deficiència de varies molècules d'adhesió cel·lular (ICAM-1, CD18, P-selectina) resulta protectora contra l'aterosclerosi experimental en ratolins (230) i que el tractament amb anticossos contra aquestes molècules evita el reclutament dels fagòcits mononuclears en la íntima aòrtica de rates amb hipercolesterolèmia (231).

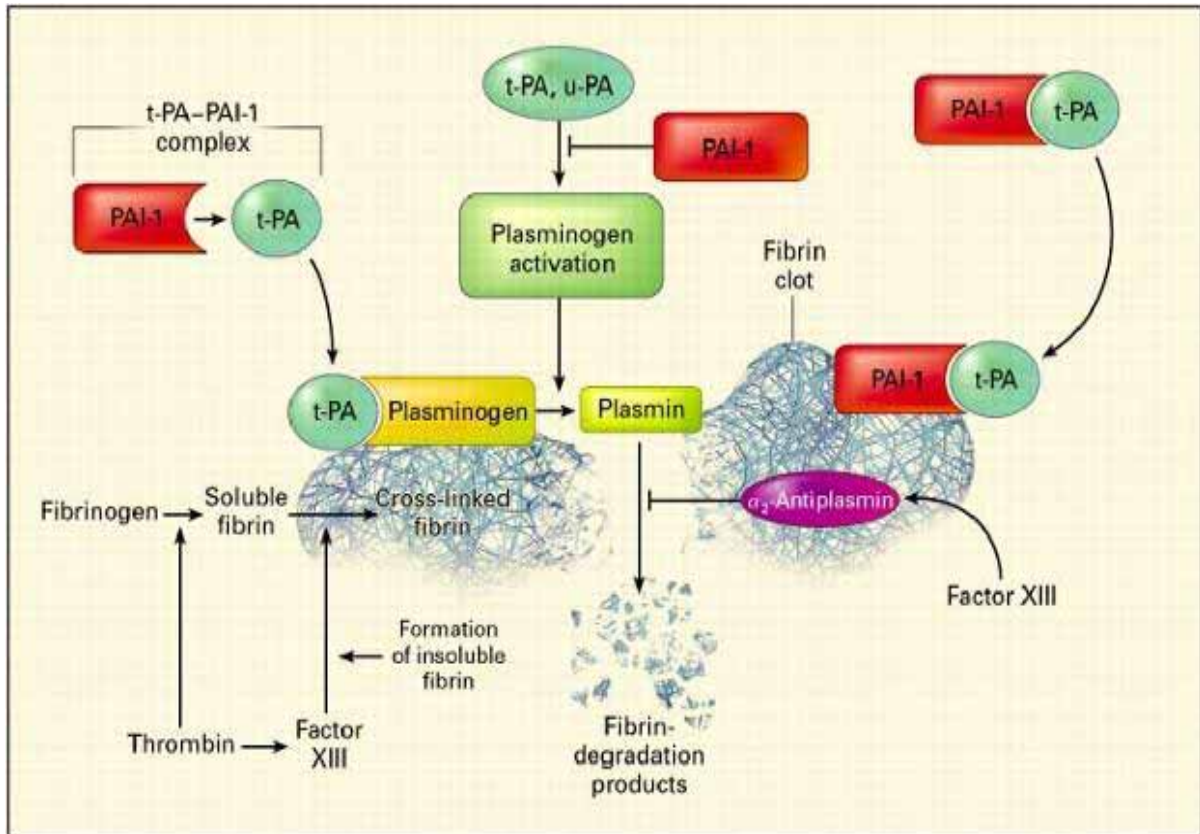
Finalment, un treball del nostre grup sobre la mateixa cohort de pacients estudiada en aquesta tesi, va observar que nivells basals elevats d'E-selectina, ICAM-1 i PAI-1 predeien la progressió de la MAIC (232).

En el quart article d'aquesta tesi, explorem la capacitat pronòstica de l'ICAM-1 i l'E-selectina en la MAIC simptomàtica en comparació amb la resta de biomarcadors.

1.2.2.3. Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus I (PAI-1):

Els processos de trombosis i fibrinòlisis són importants en la fisiopatofisiologia de l'ictus isquèmic. Un pas important en el procés fibrinolític inclou la conversió del proenzim plasminogen a la proteasa activa plasmina per part de l'activador del plasminogen tissular (tPA), la qual cosa permet la degradació de la fibrina del trombo intravascular. La inhibició del sistema fibrinolític pot tenir lloc a nivell de l'activació del plasminogen, principalment per una inhibició directa del tPA per la PAI-1 (veure **Figura 5**).

Figura 5. Esquema de la degradació del trombó per la via de la fibrinòlisis i dels diferents punts en els que poden interferir alguns dels inhibidors endògens de la fibrinòlisis (adaptat de Kohler i Grant, N Engl J Med 2000 (233)).



La PAI-1, també coneguda com serpina E1, és una glicoproteïna de cadena única unida a un pèptid senyal (234). Forma part de la superfamília dels inhibidors de les serin proteases (*serpines*) i s'engloba en el grup de les serpines inhibidores de proteases (235). La PAI-1 s'uneix al tPA mitjançant una unió covalent induint un canvi conformacional que limita el seu poder activador del plasminogen. La PAI-1 té 3 potencials punts de glicosilació i la seva forma glicosilada té una major activitat inhibidòria. L'efecte inhibidor de la PAI-1 però no és específic: també actua sobre altres substrats com la uPA, la trombina, la plasmina o la proteïna C activada.

La PAI-I circulant en plasma representa únicament el 10% del total en condicions fisiològiques, ja que el major reservori (prop del 90%) es troba contingut en els grànuls α de les plaquetes. És per aquest motiu que la concentració plasmàtica de PAI-1 pot incrementar-se fins 10 vegades quant es produeix una ferida i les plaquetes activades alliberen el seu contingut, frenant així la fibrinòlisis.

Les lipoproteïnes, la glucosa i la insulina incrementen la síntesi de PAI-1 in vitro (236) i s'ha observat una associació entre els nivells plasmàtics elevats de PAI-1 i malalties protrombòtiques com l'HTA, obesitat i diabetis (237-240).

Existeixen nombrosos estudis en la bibliografia que demostren la relació entre la elevació dels nivells de PAI-1 i la malaltia CV (241,242). Així el seguiment de més de 3000 pacients amb angina de pit va demostrar una associació entre episodis coronaris i nivells elevats de PAI-1. Finalment, és ben conegut l'efecte negatiu de PAI-1 sobre la eficàcia del tractament trombolític en l'IAM i l'ictus isquèmic reduint-ne les taxes de recanalització i incrementant les de reoclusió (243,244). Aquest fet ha motivat la síntesi per enginyeria genètica de nous activadors del plasminogen resistents a l'acció del PAI-1.

Existeixen però pocs estudis sobre la influència de la PAI-1 en la evolució de l'ictus ateroscleròtic.

Els trombus arterials solen generar-se sobre la paret endotelial danyada on turbulències de flux afavoreixen el seu creixement. La cascada de la coagulació s'activa en les fases inicials del procés: la trombina generada amplifica l'agregació plaquetària i confereix estabilitat estructural al trombo mitjançant la formació d'una xarxa de fibrina. La formació d'un trombo oclusiu però, requereix d'un temps considerable ja que el creixement i estabilització de la massa de plaquetes i fibrina ha de superar el potent poder disruptiu mecànic (elevada pressió arterial) i enzimàtic (fibrinòlisis) que en limita la progressió. La PAI-1 també pot facilitar la formació de trombes en cas de ruptura de la placa ateroscleròtica.

Tot i així, estudis experimentals han mostrat també propietats beneficioses de la PAI-1 en el procés aterogènic que fan que hi hagi certa controvèrsia sobre el seu paper. Per exemple, quan en una lesió vascular activa la coagulació i la formació de fibrina, la PAI-1 mostra propietats aterogèniques mitjançant l'estabilització de la fibrina (245). En absència de fibrina però, la PAI-1 inhibeix la migració cel·lular dins de la paret vascular i la conseqüent formació de la hiperplàsia intimal (246). La complexa funció vascular de la PAI-1 pot dependre doncs del llit vascular, tipus de lesió i de les interaccions amb altres molècules. A més, la PAI-1 és un reactant de fase aguda que es pot incrementar ràpidament en resposta a citocines inflamatòries i a la hipòxia (247)

La determinació de l'activitat fibrinolítica de cada pacient ha sigut causa de polèmica al existir diferents mètodes que en general, requereixen d'un procés llarg i complex amb resultats poc fiables. La determinació individual de les principals molècules d el procés ateroscleròtic i de trombosis vascular permetria identificar biomarcadors sobre els que es podria actuar. La PAI-1, com el principal inhibidor de la fibrinòlisis, pot jugar un paper important en aquest sentit (248).

Per exemple, 3 mesos després d'un primer AIT o ictus per MAIC, nivells elevats de PCR i PAI-1 en sang foren predictors significatius de la progressió de l'aterosclerosi intracranial i del risc de recurrència d'ictus (232).

Tot i que queden qüestions per resoldre, la PAI-1 doncs pot contribuir significativament al mecanisme de l'aterosclerosi. A més, el procés ateroscleròtic en les arteries intracranials pot tenir diferents característiques, derivades de les peculiaritats anatòmiques i hemodinàmiques del territori intracranial (68). Per tot això, en el quart article d'aquesta tesi s'estudia el paper pronòstic de la PAI-1 en la MAIC.

1.3. Cèl·lules progenitores endotelials (CPE) i factors angiogènics en la vasculopatia ateroscleròtica.

1.3.1. Definició, origen i caracterització de les CPE.

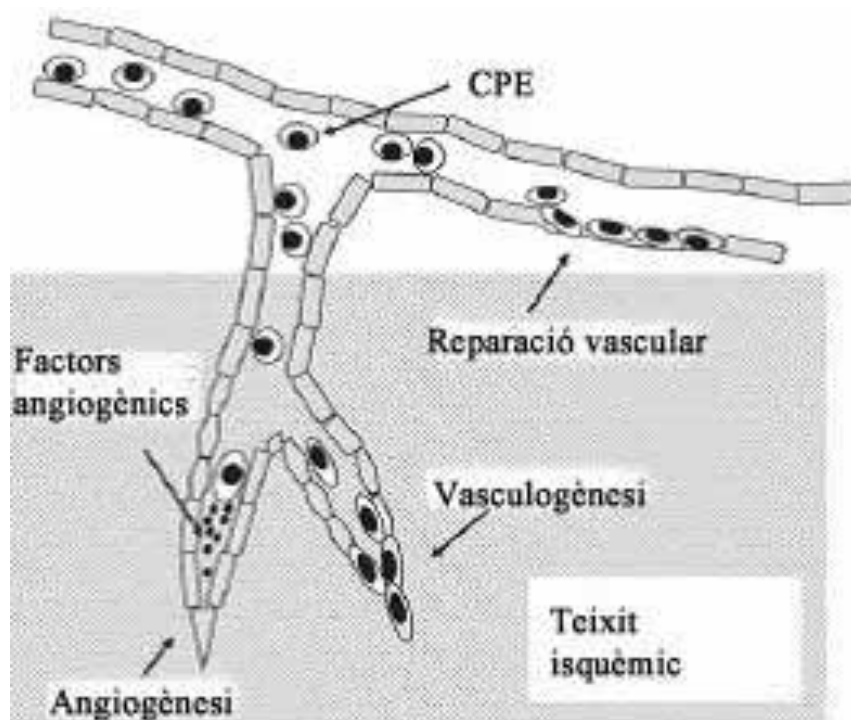
Definició i origen de les CPE:

Les CPE són cèl·lules endotelials immadures circulants en sang perifèrica derivades del moll de l'os, que provenen d'un antecessor comú de les cèl·lules hematopoiètiques i l'angioblast i que per tant, presenten un fenotip entremig. Aquestes cèl·lules tenen la capacitat de proliferar, migrar i diferenciar-se en cèl·lules endotelials madures i incorporar-se als teixits per formar nous vasos funcionals. Les CPE juguen un paper important en la reparació vascular endògena i en el manteniment de la integritat endotelial.

La primera referència que trobem en la bibliografia sobre CPE pertany a Asahara i col·laboradors (1997) (249). Els seus resultats va obligar a replantejar un paradigma fortament establert: la limitació de la vasculogènesi a l'etapa embrionària. En aquest estudi, es va utilitzar la fracció mononuclear de sang perifèrica humana per aïllar un

tipus de cèl·lules positives per marcadors de cèl·lules progenitores, el CD34, i d'altres marcadors típicament endotelials, el KDR (*kinase-insert domain-containing receptor*), també conegut com receptor del factor de creixement vascular endotelial 2 (VEGFR2). A més, van ser capaços d'expandir ex vivo aquestes cèl·lules a cèl·lules endotelials madures i van demostrar que eren funcionalment actives, ja que eren capaces d'incorporar-se al endoteli i formar capil·lars funcionals en el teixit isquèmic d'animals. Aquests autors van ser els primers a identificar les unitats formadores de colònies (UFC) com un clúster central de cèl·lules arrodonides, envoltat per les anomenades *spindle-shaped cells*, que tenen una forma fusiforme. Des del seu descobriment, s'han destinat molts esforços a entendre les característiques fenotípiques d'aquestes cèl·lules, ja que són un prometedor marcador de la funció endotelial i una potencial eina terapèutica.

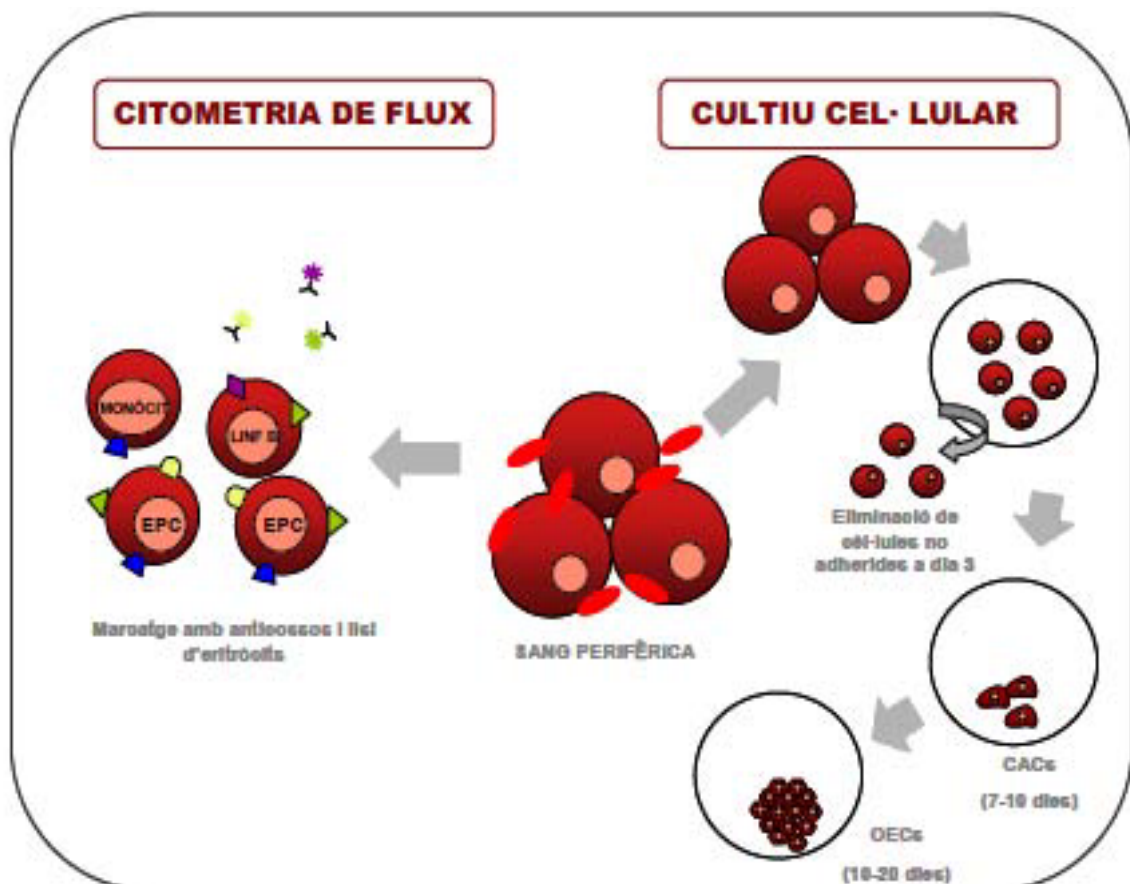
Figura 6. Representació esquemàtica de la potencial funció de les CPE en la reparació vascular, vasculogènesi i angiogènesi després de la isquèmia cerebral (adaptat de Liman, *Cerebrovasc Disease* 2012 (250)).



Caracterització de les CPE:

Existeixen dues tècniques per a la quantificació de les CPE, el cultiu cel·lular i la citometria de flux. El cultiu cel·lular es fonamenta en la capacitat d'adhesió i diferenciació *in vitro* cap a cèl·lula endotelial de les CPE. La citometria de flux es basa en la selecció fenotípica mitjançant el marcatge d'anticossos fluorescents. Tot i no ser comparables, ambdues tècniques aporten informació complementària: el cultiu cel·lular ens dóna una idea de la viabilitat i capacitat funcional de les CPE, mentre que la citometria de flux ens permet el seu recompte directe en la circulació perifèrica (251,252). A més, a diferència del cultiu cel·lular, la citometria de flux permet aïllar i quantificar les CPE de forma ràpida, quelcom important en la pràctica clínica. La citometria de flux ha estat la tècnica emprada en el tercer article d'aquest tesi.

Figura 7. Esquema dels dos mètodes utilitzats per determinar i fer recompte de les CPE en sang perifèrica: el cultiu *ex vivo* i la citometria de flux amb anticossos dirigits contra marcadors de CPE i conjugats amb tincions fluorescents (adaptat de Navarro Sobrino, Tesi doctoral 2010 (253)).



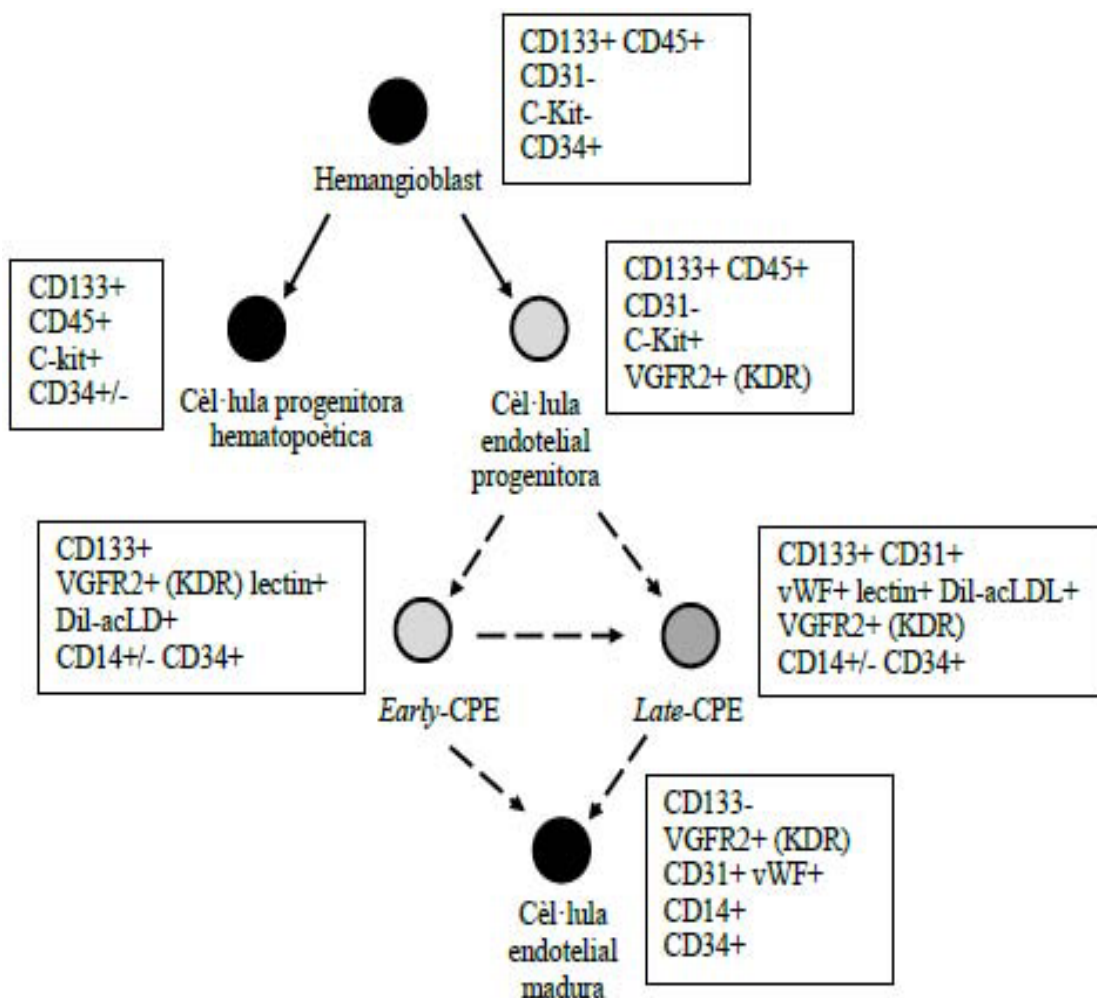
Citometria de flux:

La citometria de flux és una eina d'anàlisi que permet discriminar partícules de diferent mida i color. Amb aquest mètode es poden avaluar poblacions cel·lular d'interès mitjançant la separació i classificació cel·lular (*sorter*), la qual cosa permet la separació física de cèl·lules en funció de l'expressió d'antígens específics de membrana marcats amb anticossos conjugats amb tincions fluorescents. A partir de la fracció cel·lular mononuclear, es pretén identificar la població de CPE. Desafortunadament, les CPE són molt escasses en sang perifèrica, l'exclusió d'esdeveniments falsos positius pot ser tècnicament difícil, els nivells de CPE circulants difereixen entre estudis depenent del mètode i citòmetre utilitzats i avui en dia encara ens trobem amb certes limitacions per la posterior expansió *ex vivo*. Per això, normalment s'utilitzen només un o dos marcadors d'antígens per realitzar el *sorter*, cosa que dificulta la identificació de les diferents subpoblacions.

Actualment, la forma més extensament acceptada d'identificar les CPE mitjançant citometria consisteix en detectar la coexpressió dels marcadors de superfície CD34 (marcador hematopoietic de cèl·lula mare/progenitora) i KDR (marcador endotelial), als que es pot afegir el CD133 (marcador de cèl·lula hematopoietica més diferenciada) (254). Cal tenir en compte però que aquests marcadors caracteritzen un subtipus de CPE en un estadi específic de maduració i que cada subpoblació de CPE pot tenir diferents propietats funcionals. Així, per exemple, l'expressió del CD34 disminueix en el temps quan la CPE es diferencia cap a cèl·lula endotelial (249).

Altres marcadors fenotípics que han estat descrits per definir subpoblacions de CPE per citometria o en cultiu són el factor von Willebrand (vWF), la DiI-acLDL (lipoproteïna acetilada de baixa densitat), la UEA1-lectin (*Ulex europeus agglutinin-1 lectin*), el CD31 (molècula d'adhesió endotelial de les plaquetes), el CD45+ (*Protein tyrosine phosphatase receptor type C*), el CD62E (E-selectina), el CD144 (VE-cadherina) i el receptor tipus 4 de la quemoquina CXC (CXCR-4) (255).

Figura 8. Esquema de l'origen i llinatge de les CPE (adaptat de Navarro, Rev Neurol. 2007 (256)).



Cultiu cel·lular de les CPE:

De manera estandaritzada, basant-se en la metodologia emprada primerament per Asahara i col·laboradors, el cultiu de CPE es realitza igualment a partir de la fracció mononuclear de sang perifèrica, separant les cèl·lules marcades mitjançant un *sorter* i posteriorment, sembrant en plaques amb fibronectina o gelatina utilitzant un mitjà de cultiu per cèl·lules endotelials amb diferents factors de creixement. Després de la publicació de nous estudis, s'ha anat acceptant el concepte de CPE com una població heterogènia. Així, s'han establert dues subpoblacions d'UFC amb característiques fenotípiques i funcionals diferenciades, les anomenades *early-CPE* (o *circulating angiogenic cells* (CAC)) i les *late-CPE* (o *outgrowth-CPE* (OECs)) (257,258). Les *early-CPE* apareixen més aviat en el cultiu, als 5-7 dies, tenen la morfologia fusiforme (de

l'anglès *spindle-shaped*) i capacitat de producció de citocines proangiogèniques, mentre que les *late*-CPE apareixen a partir de les dues setmanes i formen una monocapa cel·lular tipus "llamborda" (de l'anglès *cobblestone*). Les taxes de proliferació són diferents en ambdues subpoblacions: les *early*-CPE són capaces de sobreviure en cultiu fins a vuit setmanes, mentre que les *late*-CPE tenen una major capacitat proliferativa i romanen en cultiu fins a 12 setmanes (257). També hi ha diferències en la capacitat d'aquestes cèl·lules per formar estructures tubulars en substrats de Matrigel. Les *late*-CPE tenen un major potencial per formar túbuls, tot i que es creu que aquesta capacitat està potenciada pels factors de creixement secretats per les *early*-CPE (258). Altres autors, proposen l'existència de més de dues subpoblacions dins de les CPE, i realitzen una classificació jeràrquica en funció del seu potencial clonogènic (259). Altres autors han demostrat que les UFC tenen capacitat macrofàgica i no són capaces de formar capil·lars *in vivo* (260). No hi ha doncs un consens sobre el llinatge de les CPE i hi ha controvèrsia sobre la naturalesa endotelial de les UFC, ja que sembla que comparteixen més característiques monocítiques i macrofàgiques que endotelials.

S'han destinat doncs molts esforços en la caracterització d'aquestes cèl·lules i la majoria d'estudis van en la mateixa direcció: el terme CPE englobaria diferents poblacions cel·lulars, però totes mantindrien la capacitat d'assolir un fenotip endotelial diferenciat i funcional *in vivo* i serien capaces d'estimular l'angiogènesi en cèl·lules endotelials madures. Tot i els seus múltiples orígens, mantindrien característiques comunes del seu llinatge de cèl·lula mare adulta o progenitora, com el potencial clonogènic i la capacitat proliferativa, fet que no presenten les cèl·lules endotelials madures (259).

1.3.2. Relació dels factors angiogènics de creixement (AGF) amb les CPE.

La mobilització de les CPE des del moll de l'os al torrent circulatori està promogut per certs factors (citocines, factors de creixement) estimulats per processos endògens com el dany vascular, la isquèmia o l'exercici físic (261). Concretament, la isquèmia provoca l'increment de l'expressió del factor induïble per hipòxia 1 α (HIF-1 α). Aquest factor de transcripció, indueix l'expressió del factor de creixement vascular endotelial (VEGF) que, juntament amb altres factors com els estrògens, l'òxid nítric endotelial (eON), l'eritropoietina o el factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF), incrementen

els nivells de la metal·loproteasa de matriu 9 (MMP-9). En el moll de l'os, la MMP-9 i altres proteases, trenquen els enllaços entre les CPE i les cèl·lules estromals provocant la seva alliberació a la circulació perifèrica (262). Ja en sang, el factor derivat de cèl·lules estromals 1α (SDF- 1α) guia la migració de les CPE fins l'endoteli del teixit afectat a través d'un mecanisme depenent del receptor tipus 4 de la quemoquina CXC (CXCR-4) (263,264). En el teixit afectat les CPE actuen de manera paracrina, secretant factors de creixement que estimulen la proliferació de les cèl·lules endotelials, o bé a través de la seva pròpia transformació en cèl·lules endotelials (265,266).

Els factors de creixement són proteïnes multifuncionals que potencien els processos de neovascularització i reparació endotelial per diferents vies. El factor de creixement vascular endotelial (VEGF) o el factor de creixement dels fibroblasts (FGF) actuen principalment sobre cèl·lules endotelials promovent la seva proliferació, migració, activitat tubulogènica i inhibint la seva apoptosi (267). El factor de creixement dels hepatòcits (HGF) promou l'angiogènesi de les cèl·lules endotelials i estimula la mobilització de cèl·lules progenitores hematopoiètiques (268). Altres, com el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), activen els receptors de la VEGF de les CPE (VEGFR-1 i VEGFR-2) (269). Hormones com la trombopoetina (TPO) o citocines com la SDF- 1α i el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) també activen les cèl·lules endotelials (270-272).

La hipòxia estimula la diferenciació de les CPE mitjançant l'alliberació de factors com el VEGF (273,274), PDGF-BB, FGF i HGF.(272,275) Així, s'ha comprovat en rates que les CPE en condicions d'hipòxia mostren majors propietats angiogèniques que *in vivo* (273). També s'ha demostrat a més que les pròpies CPE secreten els factors de creixement HGF, VEGF, l'FGF i PDGF-BB en pacients amb ictus isquèmic (272,273). Alguns d'aquests factors presenten també propietats neurogèniques. El VEGF, per exemple, ha mostrat tenir un efecte neuroprotector potenciant la supervivència de les neurones (276).

1.3.3. CPE i AGF en la malaltia cerebrovascular.

En models animals de dany endotelial, s'ha demostrat que les CPE milloren la vasoreactivitat arterial i acceleren la reendotelització, reduint així la formació de la neointima (277,278). Diversos estudis han mostrat que un baix nombre d'CPE circulants incrementa el risc de patir una patologia CV i prediu futurs esdeveniments

isquèmics en pacients amb malaltia coronària (279-281). A més, el nombre d'UFC ha mostrat una correlació inversa amb la funció endotelial (mesurada mitjançant la dilatació mediada per flux de la artèria braquial) i la puntuació en l'escala de Framingham (279). Això suggereix que les CPE es correlacionen amb el dany endotelial i la progressió de la malaltia CV.

El paper de les CEP en les malalties cerebrovasculars és menys conegut ja que els resultats obtinguts fins al moment són més confusos.

En pacients amb ictus, s'ha observat que el nombre d'CPE es correlaciona inversament amb l'edat i altres FRCV com el tabaquisme (282), la hipertensió (283), la diabetis (284,285) o l'aterosclerosi (286).

Taguchi i col·laboradors van realitzar un estudi en ictus isquèmics d'etiologia aterotrombòtica emprant citometria de flux (287). Observaren un increment gradual de cèl·lules progenitores circulants (CD34+) després de l'esdeveniment isquèmic fins al setè dia, seguit d'una disminució fins assolir els valors basals als 30 dies. Van trobar a més una correlació inversa entre el nombre de cèl·lules progenitores (CD34+ o CD133+) i el nombre d'infarts en la RM, i una correlació positiva entre aquestes cèl·lules i el flux sanguini cerebral mesurat mitjançant tomografia per emissió de positrons. En altres estudis, s'ha observat que els pacients amb ictus amb nivells disminuïts de cèl·lules CD34+ mostren un empitjorament significatiu en la taxa de recurrència d'ictus, índex de Barthel i la taxa de demència clínica (287,288). Aquests resultats suggeriren que les cèl·lules progenitores podrien utilitzar-se com a marcador de la funció cerebrovascular i tenen un valor pronòstic en el manteniment de la circulació cerebral.

Yip i col·laboradors van trobar que 3 poblacions de CPE (CD31+/CD34+, CD62E+/CD34+ i CD34+/KDR+) estaven més disminuïdes en els individus amb FRCV que en els pacients amb ictus agut i controls sans. A més, els nivells baixos de les 3 poblacions eren predictores d'un pitjor NIHSS a les 48 hores i les CD34+/KDR+ a les 3 setmanes (289). Altres estudis però han trobat que, l'increment de cèl·lules progenitores (CD34+, CD133+ i CD34+/CD133+) circulants, però no de CPE (CD34+/KDR+, CD133+/KDR+ i CD34+/CD133+/KDR+) determinades a les 72 hores d'un ictus isquèmic s'associen amb un millor pronòstic neurològic (290).

També s'han demostrat nivells baixos de CPE en pacients amb arteriopatia cerebral autosòmica dominant amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia (291) i en canvi nivells incrementats en pacients amb malaltia de moyamoya (292).

Tot i que és un mètode de quantificació indirecte discutit, alguns estudis s'han centrat el recompte d'UFC de CPE. Així Ghani i col·laboradors van mostrar que en els pacients que havien patit un ictus, el nombre d'UFC (CD31 o vWF) era significativament menor en comparació amb controls sans, especialment en la fase aguda de l'ictus (293). Chu i col·laboradors van obtenir resultat similars observant també una capacitat tubulogènica reduïda en l'ictus agut; a més, els pacients amb malaltia ateroscleròtica de gran vas tenien un menor nombre d'UFC i activitat funcional que els d'etiologia cardioembòlica. Per contra, les *outgrowth-CPE* s'aïllaven més freqüentment en pacients amb ictus agut que durant la fase crònica i, encara eren menys presents en els controls sans (285). En un altre treball s'observà un increment de les *early-CPE* als set dies i fins al tercer mes de l'ictus isquèmic en els pacients amb bon pronòstic funcional (294). També s'ha informat d'una correlació inversa entre el nombre d'UFC i els canvis en substància blanca relacionats amb l'edat (295).

En un estudi del nostre grup, es van observar nivells més elevats de CPE (CD133+/CD34+/KDR+/CD45+), així com un major creixement de CPE en cultius, durant la fase aguda de l'ictus que durant la subaguda o en controls sans, correlacionant-se positivament els nivells i l'aparició d'*outgrowth CPE* amb la gravetat clínica de l'ictus. En canvi, es va trobar una màxima capacitat vasculogènica de les CPE en la fase subaguda de l'ictus (3-7 dies). Es concloué que l'increment agut del nombre de CPE en sang pot ser degut a una ràpida alliberació des del moll de l'os en resposta a l'estímul isquèmic-inflamatori, mentre el posterior increment de la funcionalitat podria explicar-se per l'activació de la angiogènesi amb l'expressió i secreció d'AGF. Així doncs les CPE aïllades en la fase subaguda podrien ser més efectives per l'ús terapèutic (272).

Taula 7. Selecció dels estudis observacionals que han investigat el paper de les CPE en l'ictus isquèmic i altres malalties cerebrovasculares (adaptat de Liman et al, Cerebrovasc.Disease 2012 (250)).

Estudi	Població de pacients	Resultat i correlació de variables	Punts de temps/ seguiment	Marcadors de superfície de les CPE/ mètode	Principals troballes
Taguchi et al, Circulatioon 2004	n=25 amb ictus isquèmic agut	Curs de la mobilització; CBF; CMRO ₂ amb PET	Dia 0, 3, 7, 14, 30	CD34/CD133 Citometria de flux	Pic de cèl·lules CD34+ al dia 7, correlació positiva cèl·lules CD34+ amb CBF i CMRO ₂ , negativa amb nombre d'infarts
Yip et al, Stroke 2008	n=138 amb ictus agut n=20 controls n=40 alt risc	Puntuació NIHSS	Dia 0-2, 21 i 90	CD31/CD34, CD62E/CD34, CD34/KDR	Correlació nivells baixos de CPE NIHSS≥12 a les 48 h i de CD34+KDR+ amb NIHSS≥4 al dia 21
Sobrino et al, Stroke 2007	n=48 amb ictus agut	Puntuació NIHSS; creixement de la lesió amb RM	Dia 0, 7; mRS al dia 90	CPE-UFC Cultiu cel·lular	Correlació increment de CPE després de l'ictus amb mRS≤2 i menor creixement de l'infart
Bogoslovsky et al, Neurology 2010	n=18 amb ictus agut	Creixement de la lesió amb RM	Volums DWI al dia 0, 5; FLAIR al dia 10	CD34/CD133/KDR Citometria de flux	Correlació nivells més alts de CPE amb menor volum i creixement de l'infart
Rafat et al, Stroke 2009	n=amb malaltia de moyamoya n=15 controls	Nivells de CPE	–	CD34/CD133/KDR Citometria de flux	Nivells més alts de CPE en pacients amb malaltia de moyamoya
Pescini et al, Stroke 2010	n=29 amb CADASIL n=29 controls	Nivells de CPE	–	CD34/CD133/KDR Citometria de flux	Nivells més baixos de CPE en pacients amb CADASIL
Jickling et al, Stroke 2009	n=172 amb història d'ictus o AIT	Recompte d'UFC; lesions en substància blanca (TC)	–	CD31, vWF Cultiu cel·lular	Nivells més baixos de CPE en pacients amb lesions severes de substància blanca relacionades amb l'edat
Navarro-Sobrino et al, Microvasc Res 2010	Ictus agut tractat amb rt-PA (n=30) o no (n=12) n=18 ictus subagut n=16 controls	Nivells de CPE, recompte d'UCF, capacitat tubulogènica	3-24h, 3-7 dies.	vWF, UEA1-lectin, KDR, CD133 Cultiu cel·lular CD133/CD34/KDR/CD45 Citometria de flux	Major nombre i creixement de CPE en l'ictus agut. Major capacitat vasculogènica en l'ictus subagut

CBF = Flux sanguini cerebral; CMRO₂ = Taxa metabòlica cerebral d'oxigen; PET = tomografia per emissió de positrons; DWI = *diffusion weighted imaging*; FLAIR = *fluid attenuated inversion recovery*; CADASIL = arteriopatia autosòmica dominant amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia.

En resum, tot i la disparitat de marcadors, la majoria d'estudis per citometria assenyalen un augment de les CPE en l'ictus agut (fins al setè dia), així com una correlació inversa entre el nombre de CPE, la presència de patologia cerebrovascular ateroscleròtica i un pitjor pronòstic neurològic. Els estudis mitjançant cultiu mostren resultats dispars. En tot cas, els baixos nivells d'UFC en pacients amb patologia cerebrovascular podrien indicar una disfunció vascular representada per un estat disfuncional de les CPE i la presència de cèl·lules *outgrowth* la resistència a l'estrès isquèmic agut.

Els resultats sobre el paper de les CPE com a biomarcador pronòstic tampoc són clars, però assenyalen que un major nombre d'CPE circulants s'associa a un millor pronòstic i funció cerebrovascular. Si això es confirmés, l'ús de les CPE com a teràpia cel·lular podria ser beneficiós.

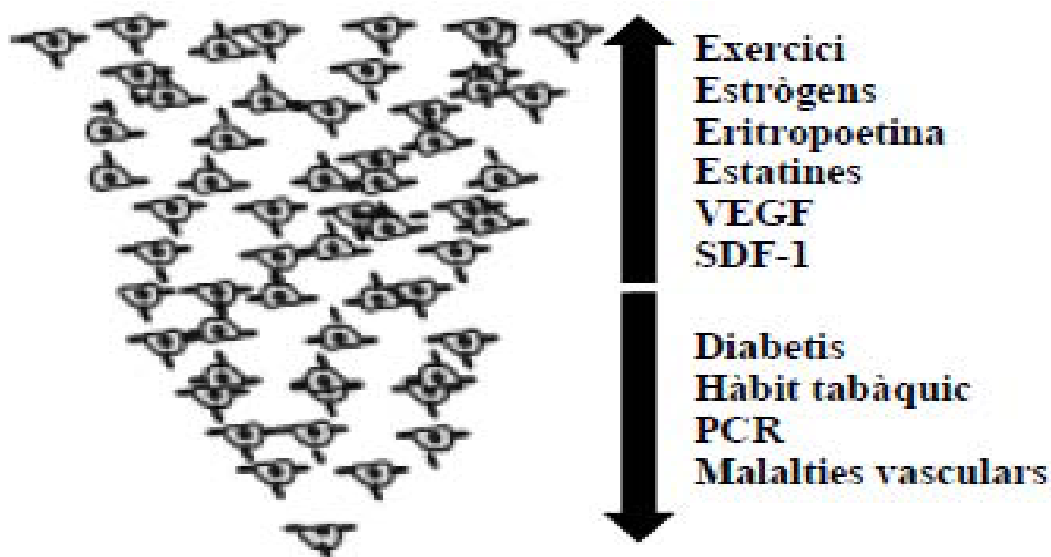
CPE i AGF com a diana terapèutica:

L'exercici incrementa el nombre d'CPE circulants en homes i porta a un increment en la neovascularització i disminució de la formació de neoíntima en ratolins després d'una lesió carotídia (296). Altres factors relacionats amb l'estil de vida i funcionalitat disminuïda de les CPE són la obesitat, la hipercolesterolèmia, el tabac i l'estrès.

L'abandonament del tabac comporta una ràpida restauració dels nivells d'CPE després de 4 setmanes, de forma similar als efectes de l'abandonament del tabac en la funció endotelial (297).

A més, s'ha demostrat que l'administració d'estatines en ratolins comportava un increment dels nivells de CPE que promovia una re-endotelització i una disminució de la lesió vascular (298). Altres fàrmacs cardiovasculars com els inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina (IECA), els antagonistes del receptor de l'angiotensina II (ARA-II), els beta-bloquejants i l'eritropoetina també han demostrat un efecte beneficiós en la mobilització i funció de les CPE circulants (299,300) i podrien jugar un paper en futurs tractaments de les malalties CV.

Figura 9. Condicions que influencien el recompte de CPE en sang perifèrica i el seu potencial proliferatiu (adaptat de Miller-Kasprzak et al, Arch Immunol Ther Exp 2007 (301)).



A més de com a diana terapèutica el trasplantament de CPE també pot ser útil. La utilització de CPE com a teràpia cel·lular en l'IAM ja és una realitat: s'han portat a terme uns 14 assajos clínics i els resultats mostren una lleugera millora en la funció cardíaca (302). En la isquèmia perifèrica també s'ha demostrat que el trasplantament de CPE pot millorar el pronòstic dels pacients.(303) i recentment l'administració d'CPE ha demostrat millorar el pronòstic a llarg termini en ratolins després d'una oclusió transitòria de l'ACM (304).

Tot i això, les reaccions del sistema immune al trasplantament de cèl·lules, així com el baix nombre de cèl·lules progenitores existents, són importants limitacions pràctiques en la seva aplicació clínica. És per això, que la potenciació dels processos angiogènics mitjançant factors que s'expressen de forma endògena podria ajudar. Tenint en compte la limitada vida mitja dels AGF, així com la seva dificultat per travessar la BHE, hi ha investigacions que s'han centrat en el tractament amb aquests factors mitjançant transferència gènica. En algun d'aquests estudis s'ha demostrat un efecte beneficiós d'aquesta transferència, per exemple millorant la recuperació funcional en rates tractades després d'una isquèmia cerebral (305).

En resum, el paper de les CPE i els AGF en el manteniment de la funció endotelial fa que siguin prometedors marcadors de la funció vascular i el risc vascular acumulat. L'estimulació de la angiogènesi i la reparació endotelial podria millorar el pronòstic evolutiu de malalties CV com la MAIC i determinar el moment per potenciar aquest procés seria d'ajuda a la pràctica clínica. Per tant, l'estudi dels AGF en relació amb els nivells de les CPE i la gravetat de la MAIC (objectiu del tercer treball de la present tesi) pot resultar rellevant.

2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi és explorar diverses famílies de proteïnes, poblacions cel·lulars sanguínies i variacions genètiques relacionades amb la inflamació, fibrinòlisi i angiogènesi per aprofundir en la fisiopatologia de la malaltia ateroscleròtica cerebral i avaluar si podrien ser útils com a biomarcadors pronòstics i de gravetat en aquests tipus de pacients.

Els objectius concrets són:

- 1. Proteïnes:** Investigar en pacients amb malaltia ateroscleròtica cerebral simptomàtica la relació existent entre els biomarcadors d'inflamació (PCR, Lp-PLA2, E-selectina, ICAM-1), inhibició de la fibrinòlisi (PAI-1) i factors angiogènics (VEGF, PDGF-BB, FGF, HGF) amb la gravetat de la malaltia i el risc de nous ictus i esdeveniments isquèmics.
- 2. Gens:** Investigar la relació existent entre la presència del polimorfisme C1444T de la PCR amb la recurrència d'ictus i esdeveniment isquèmic en pacients amb malaltia ateroscleròtica cerebral simptomàtica.
- 3. Cèl·lules:** Conèixer la relació dels nivells de CPE circulants amb la gravetat de la malaltia ateroscleròtica cerebral i la seva variació respecte la població sana.
- 4. Clínica:** Estudiar la relació de l'ITB amb la recurrència d'ictus en pacients amb malaltia ateroscleròtica cerebral simptomàtica.
- 5. Models de predicció:** Valorar la utilitat de la inclusió de biomarcadors circulants en la predicció de les escales clíniques de risc de recurrència d'ictus (ESRS).

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Selecció de pacients, variables clíniques basals i seguiment.

Els pacients inclosos en tots els estudis d'aquesta tesi van ser atesos al servei d'Urgències o a la Unitat d'Ictus de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. En tots els casos es va sol·licitar el consentiment informat per part dels pacients o els seus familiars i tots els estudis van ser aprovats pel comitè ètic de l'Hospital Vall d'Hebron d'acord amb la Declaració de Hèlsinki.

La intenció en els treballs va ser estudiar a pacients consecutius amb un primer AIT o infart cerebral degut a estenosis intracranials de probable origen ateroescleròtic. A continuació s'enumeren els criteris d'inclusió i exclusió, compartits en les quatre treballs publicats.

Criteris d'inclusió

- Diagnòstic d'un primer infart cerebral o AIT.
- Detecció d'estenosis intracranials mitjançant DTC, posteriorment confirmades per una tècnica angiogràfica (angiografia convencional, ARM o ATC).
- Obtenció de consentiment informat.

Criteris d'exclusió

- Edat inferior a 18 anys.

Presència d'altres possibles causes d'ictus i estenosis d'origen no ateroescleròtic:

- Desaparició del senyal d'estenosi durant l'ingrés en els pacients amb estenosis úniques potencialment simptomàtiques.
- Història de cardiopatia embolígena, o demostració d'una font cardioembòlica mitjançant ecocardiografia, Holter, o detecció de shunt dreta-esquerra per DTC.
- Presència d'una estenosi significativa de l'ACI cervical ipsilateral a una estenosi intracranial potencialment simptomàtica.
- Origen no ateroescleròtic de les estenosis intracranials: vasculitis infecciosa o no infecciosa, estat protrombòtic, angiopatia postràdica, síndrome de Sneddon, malaltia de moyamoya, etc.

Situacions que poden alterar les concentracions dels marcadors inflamatoris i de la fibrinòlisis a estudi (en el primer, segon i quart treballs):

- Ictus isquèmic, episodi coronari, aparició de símptomes de claudicació intermitent, traumatisme, cirurgia o utilització de medicació immunosupressora en els tres mesos previs a l'extracció basal.
- Procés infecció, malaltia inflamatòria, autoimmune o neoplàsica activa.
- Embaràs o lactància.
- Disfunció tiroïdal, insuficiència renal o hepàtica crònica.
- Abús d'alcohol o drogues.

Situacions que poden alterar la història natural de la malaltia o impedeixen el seguiment del pacient:

- Finestra acústica transtemporal deficient (en el primer i segon treballs).
- Tractament de les estenosis mitjançant angioplàstia o *stent*.
- Incapacitat funcional important ($mRS > 3$) que impedeix acudir a les visites.

Factors que poden alterar els nivells de les CPE circulants:

- Pacients sotmesos a tractament hormonal substitutiu, eritropoetina o transfusions.

El tercer treball té un disseny transversal a partir de les dades obtingudes en el moment de la determinació de les CPE. Per això en van quedar exclosos:

- Pacients no localitzables en el moment de l'estudi o que no van donar el corresponent consentiment informat.

En aquest tercer treball es va seleccionar un grup de controls a partir dels familiars i acompanyants dels pacients. Amb la intenció de descartar malaltia cerebrovascular van ser exclosos d'aquest grup control:

- Individus amb antecedents de patologia cardiovascular.
- Individus amb un estudi ultrasonogràfic Dúplex transcranial o de TSA anormal.

Procés diagnòstic

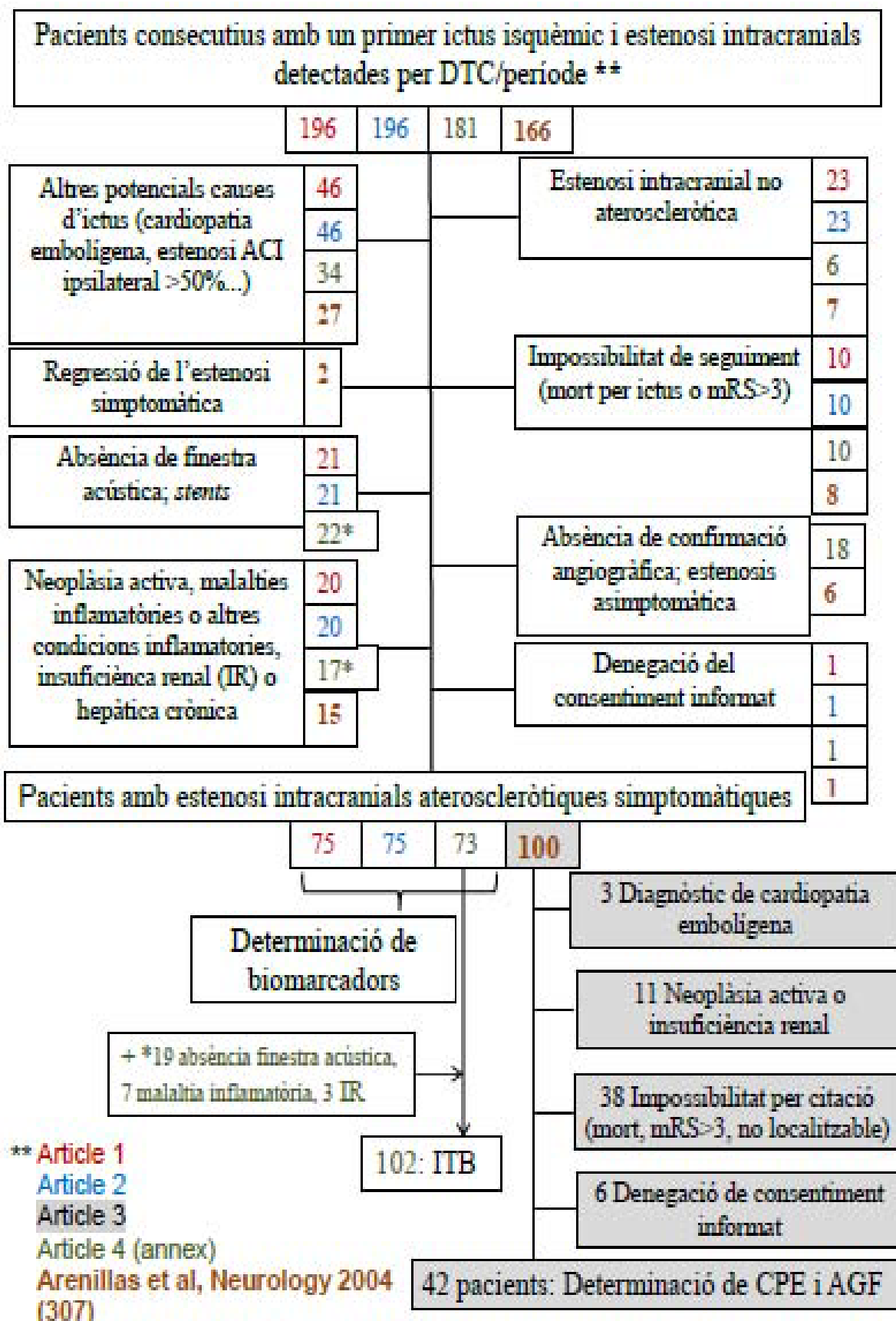
Les exploracions a les que va sotmetre als pacients inclouen:

1. Historia clínica, exploració física, analítica general (amb hemograma, VSG i bioquímica), electrocardiograma i radiografia de tòrax.
2. Estudi DTC i de TSA durant les primeres 72 hores des de l'arribada a Urgències. Seguiment mitjançant DTC de les estenosis simptomàtiques durant l'ingrés.
3. Estudi del parènquima cerebral mitjançant TC o RM cranial i ARM, ATC o arteriografia convencional durant l'ingrés.
5. Ecocardiografia transtoràstica i/o transesofàgica, Holter i detecció de shunt dreta-esquerra per DTC.
6. Estudi immunològic i de funció tiroïdal. Estudi de trombofilia en els pacients sense FRCV coneguts (adaptat d'Arenillas, Tesis doctoral 2003 (17)).

Mostra estudiada

Els pacients van ser inclosos en els següents períodes: entre juny 2001 i gener 2004 en el primer treball, entre juny 2001 i agost 2003 en el segon i tercer treballs i entre abril 2002 i juliol 2004 en el quart treball. El procés de selecció dels pacients inclosos en els diferents treballs i les raons d'exclusió de la resta de possibles candidats estan esquematitzades en la **Figura 10**.

Figura 10. Diagrama explicatiu del procés de selecció dels pacients inclosos en els diferents treballs.



En el primer, segon i quart estudis, després de la visita inicial, realitzada un mínim de tres mesos després de l'ictus, els pacients foren visitats en els mesos 1, 3, 6, 9 i 12 del primer any i cada sis mesos posteriorment durant un període mitjà d'entre 21.5 i 23 mesos.

Variables clíniques i radiològiques basals

El moment considerat temps 0 o basal, al que es refereixen les següents variables, va ser la visita realitzada un mínim de tres mesos després de l'ictus, en la que es van obtenir les mostres de sang pels biomarcadors i l'ITB.

Les variables analitzades, estan definides convenientment en l'apartat *Subject and Methods* de les publicacions i són: edat, sexe, FRCV, presentació com AIT o infart cerebral, puntuació màxima NIHSS obtinguda durant l'ingrés i tractament mèdic assignat.

En el tercer treball els FRCV i el tractament van actualitzar-se en el moment de determinar les PCE i AGF.

Protocol de l'estudi ultrasonogràfic.

Les exploracions de DTC van ser realitzades amb un aparell Multi-Dop X/4TCD (DWL Elektronische Systeme GMBH, Überlingen, Alemania), utilitzant una sonda de ultrasons polsats a una freqüència de 2 MHz. El mètode d'insonació utilitzat va ser l'estàndard descrit per Aaslid i Lindegaard (23,306).

L'examen s'iniciava amb l'estudi dels TSA utilitzant una sonda contínua de 4 MHz. En cas d'apreciar-se una estenosi superior al 50% s'explorava novament les ACI mitjançant un Eco-Doppler. Les estenosis carotídiades van ser classificades en lleus, moderades i importants segons criteris validats (veure segon article).

Per obtenir una major informació sobre el DTC, incloent la definició d'estenosi intracranial i els criteris utilitzats per classificar la gravetat de les estenosis, es remet al lector a l'apartat 1.1.2 de la Introducció.

Es van fer exploracions de DTC en els mesos 1, 3, 6, 9 i 12 del primer any i cada sis mesos posteriorment. Es va definir la progressió de les estenosis d'ACM com un increment >30 cm/seg en la Vm màxima entre dos exploracions consecutives i

persistent en el següent examen. Es va considerar regressió de les estenosis un decrement de la Vm màxima >30 cm/seg. Entre ambdós extrems, es va interpretar que l'estenosi era estable.

Finalment, en el tercer treball l'estudi es va realitzar amb un Dúplex TC i de TSA.

Angiografia per RM i per TC

La descripció detallada dels protocols d'ARM i ATC pot trobar-se en l'apartat *Subjects and Methods* d'un treball anterior del nostre grup: Arenillas et al, Neurology 2004 (307).

Seguiment clínic

Els *end-points* del primer, segon i quart treballs van ser:

1. Nou ictus isquèmic, infart cerebral o AIT.(únic *end-point* del quart treball)
2. Episodi coronari isquèmic: angina inestable o IAM.
3. Mort d'origen vascular.

Figura 11. Esquema del protocol i seguiment del primer, segon i quart treballs:

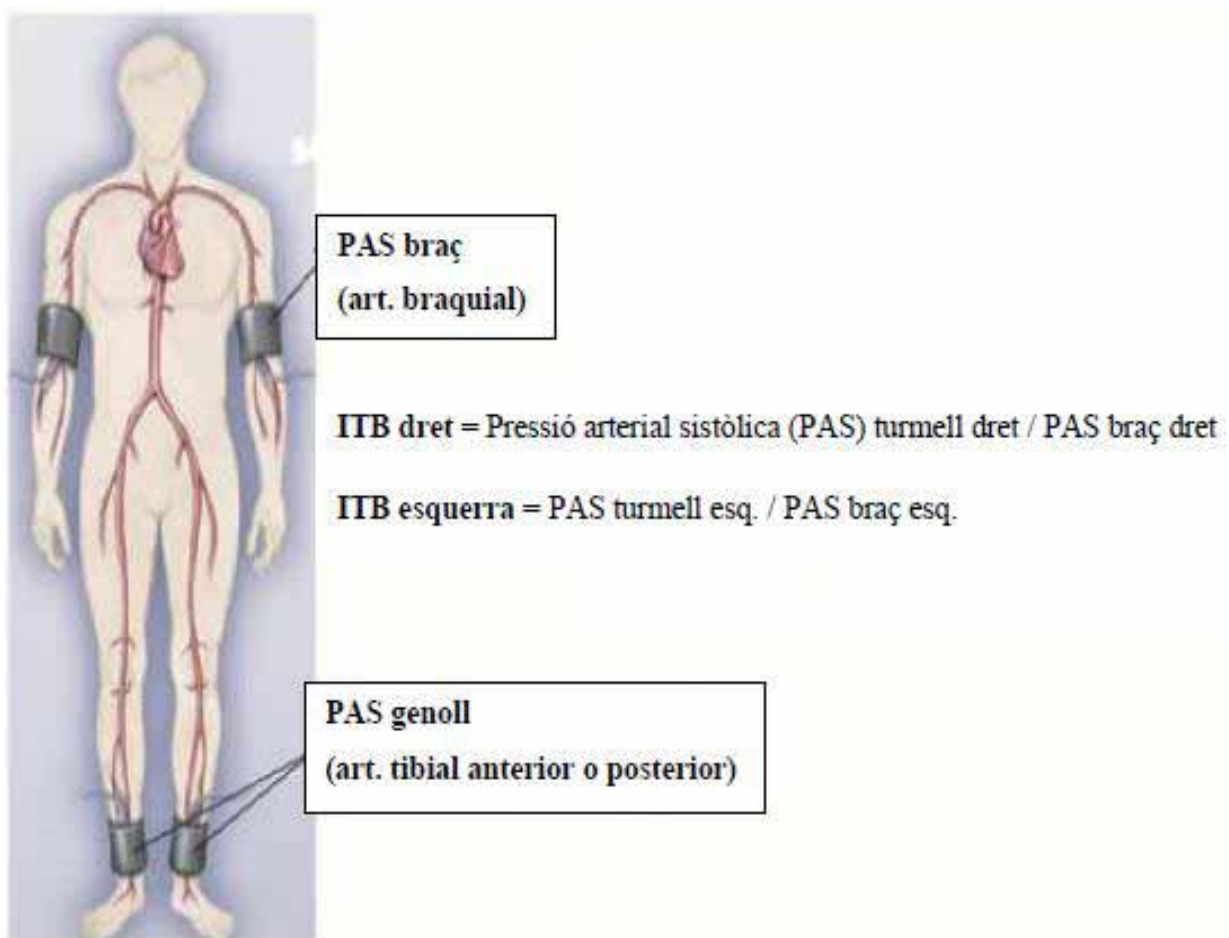


3.2. Protocol de l'ITB

Per la determinació de l'ITB es va utilitzar un esfigmomanòmetre estàndard i un aparell de Doppler d'ona continu (Elektronische Systeme GmbH, Germany) amb una sonda de 8 MHz. Amb el pacient en decúbit supí, després de 5 minuts en repòs, sobre cada avantbraç i mal·lèols tibials es va mesurar la pressió sistòlica de les artèries braquials, tibials anteriors i tibials posteriors un cop en cada cantó.

D'acord amb les guies de l'American Heart Association (AHA) i la Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II), l'ITB es va calcular, per cada cantó, com la proporció entre la pressió sistòlica més alta de les 2 artèries d'aquella cama (tibial anterior o posterior) i la més alta d'ambdós braços (308,309). L'ITB més baix d'ambdós cantons va ser l'utilitzat per definir les següents categories: ITB severament disminuït (<0.8), mitjanament disminuït (0.8-0.89), normal (0.9-1.3) i alt-potencial calcificació en l'arteria de la cama (>1.3).

Figura 12. Esquema del procediment emprat per mesurar l'ITB.



3.3. Obtenció i anàlisi de les mostres biològiques

3.3.1. Determinació de la hs-PCR, PLA-A2, E-selectina, ICAM-1, PAI-1 i AGF

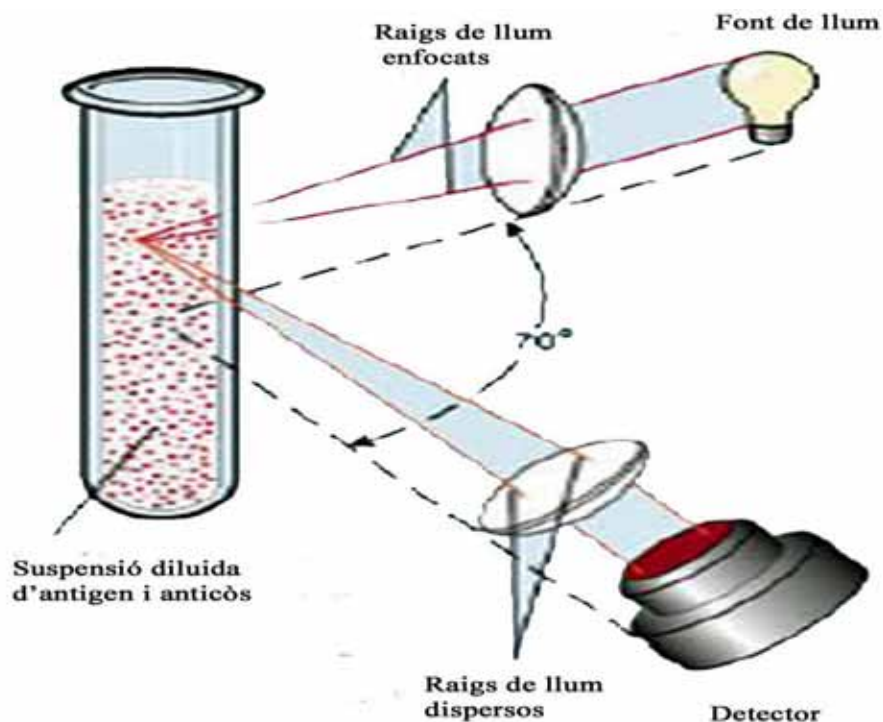
Determinació de la concentració de PCR

Per determinar la concentració sèrica de la hs-PCR es va seguir el següent procediment:

1. Extracció de sang d'una vena antecubital, deixant reposar la mostra a temperatura ambient (TA) durant 30 minuts.
2. Centrifugació a 3500 rpm a 4°C durant 15 minuts.
3. Pipetejat del sèrum en alíquotes. Etiquetat mitjançant codis per assegurar un posterior anàlisi cec.
4. Emmagatzematge a -80°C fins la seva anàlisi.
5. Determinació de la concentració de hs-CRP utilitzant un analitzador per nefelometria Boehringer. Concentració expressada en mg/dl.

Totes les determinacions es van fer per duplicat, i es va utilitzar el valor mig d'ambdues determinacions.

Figura 13. Esquema de la tècnica de nefelometria utilitzada per mesurar la hs-PCR.



Determinació de la massa i activitat de la Lp-PLA2:

La determinació de la massa i activitat de la Lp-PLA2 va seguir el següent procediment:

1. Recollir mostres de sang en tubs d'EDTA. Centrifugar de forma immediata a 3500 rpm durant 15 mins. a 4°C. Extreure el plasma en alíquotes que es van codificar de forma cega. Conservar a -80° fins a realitzar els següents anàlisis.

Mètode turbidimètric per la determinació quantitativa de la massa de Lp-PLA2

(PLAC® Test Reagent Kit,):

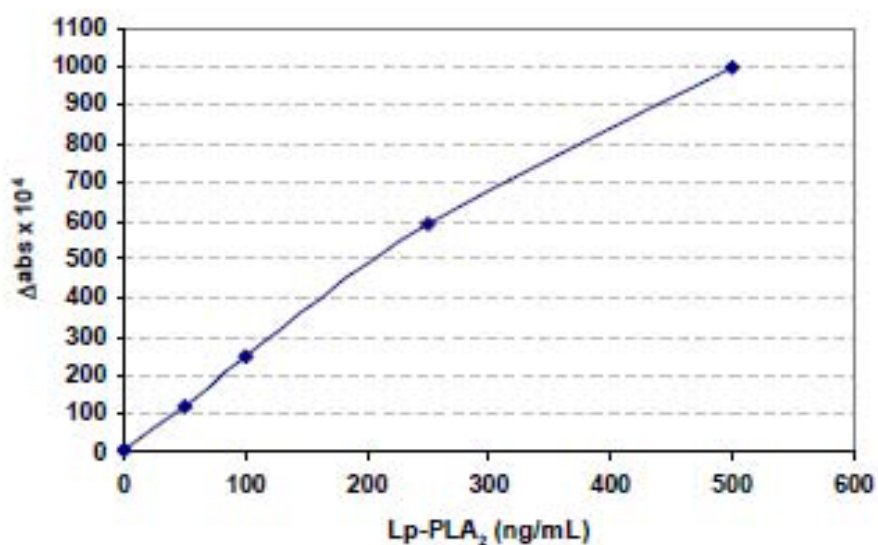
El PLAC Test és un immunoassaig turbidimètric automatitzat (Olympus AU 2700) que utilitza la tècnica del sandvitx per immunoabsorció lligada a 2 anticossos monoclonals específics.

Els passos que es segueixen es detallen a continuació:

1. Incubació de la mostra amb el reactant tampó (6 µl de la mostra a estudiar en la cèl·lula de reacció diluïts en 185 µL de reactiu tampó) durant 5 minuts a 37°C. Llegir de forma continua la absorbància a 570 nm durant 5 mins.
2. Afegir un segon reactant de micropartícules recobertes amb l'anticòs monoclonal anti-Lp-PLA2. Mesurar el diferencial de l'absorbància des del moment en que s'afegeix i fins la lectura final.
3. Extrapolar la concentració de Lp-PLA2 per comparació amb una corba estàndard d'absorbància obtinguda amb un kit de calibradors de Lp-PLA2.

Figura 14. Exemple de corba de calibració estàndard amb lectures d'absorbància a 570 nm. (eix y), traçat contra les concentracions de Lp-PLA2 (eix X).

Lp-PLA ₂ (ng/mL)	Absorbance ($\Delta\text{abs} \times 10^4$)
0	4
50	121
100	247
250	592
500	1001



Com que les variacions intra i inter assaig van ser baixes, les mostres es van analitzar mitjançant mesures úniques.

Mètode enzimàtic colorimètric per quantificar l'activitat de la Lp-PLA₂(Lp-LA2 CAM, diaDexus Inc.):

El mètode d'Activitat Colorimètrica mesura l'activitat de l'enzim en plasma i sèrum en un format de plaques de 96 pous, mitjançant la mesura d'una taxa cinètica linear.

Els passos que es segueixen es detallen a continuació:

1. Preparar una corba de calibració amb p-Nitrofenol un cop per setmana per assegurar una adequada lectura del lector de plaques:

- Es prepara 1M de p-Nitrophenol (PNP) de solució *stock* en metanol.

- De la solució *stock* d'1M de p-Nitrophenol, es preparen solucions intermitges de 0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 nmols en metanol (MeOH).

- Es preparen les solucions de treball fresques a partir de les solucions intermitges de PNP de la corba de calibració diluint 40µL de cada calibrador intermedi en 960µL de MeOH (dil 1:25).

2. Es prepara el tampó de reacció CAM barrejant 12.1 mL del reactiu tampó amb detergent de l'assaig CAM i 0.073 mL de substrat Lp-PLA2. Es conserva a TA a les fosques per ser utilitzat dins de les 2 hores següents a la preparació.

3. S'afegeixen 25µL de cada calibrador, mostra o control, per duplicat en els pouets de la placa.

4. S'afegeixen 110µL de tampó de reacció CAM a cada un dels pouets, completant el procés en no més de 40 segons, es vorteja la placa i es llegeix a 405nm cada 15 segons durant 5 minuts a TA.

5. Mitjançant un software específic (GEN5™ CL), utilitzant el canvi en l'absorció per cada pouet entre els 60 i 180 segons i la pendent de la corba de calibració amb p-Nitrofenol, es calcula l'activitat de la Lp-PLA2 mitjançant la següent fórmula:
Activitat LpPLA2 (nmol/min/mL) = pendent de la mostra ÷ pendent de la corba estàndard de p-Nitrofenol ÷ 0.025 mL

Totes les mostres es van testar per duplicat.

Determinació de d'E-Selectina, ICAM-1 i PAI-1

1. Es van mesurar els nivells d'E-selectina, ICAM-1 en sèrum i PAI-1 en plasma-EDTA mitjançant tècniques tradicionals d'ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) en sandvitx. Es van utilitzar els següents ELISA comercialitzats: ICAM-1 (Bender MedSystems Diagnostcs GmbH), en ng/mL; E-selectina (Bender MedSystems Diagnostics GmbH), en ng/mL; PAI-1 (Biopool Menarine), en ng/mL.

2. Es van quantificar els nivells de les molècules d'interès mitjançant l'extrapolació de les concentracions a una corba patró de concentració coneguda.

La determinació de cada marcador es va fer per duplicat i es va utilitzar el valor mig de les dues determinacions.

Determinació de factors angiogenics

1. Per valorar en plasma dels nivells dels promotors angiogènics PDGF-BB, HGF, FGF i VEGF es va utilitzar un *array* de proteïnes comercials de la plataforma *Searchlight*® : l'*Angiogenesis Array 2* (Aushon Biosystems).

La plataforma *Searchlight*® és un *array* de proteïnes que es basa en el sistema d'ELISA múltiple, en el qual hi ha diferents anticossos adherits a cada pouet de la placa, permetent la detecció de diferents molècules d'una mostra simultàniament dins d'un mateix pou.

2. Es produeix un senyal de quimioluminescència amb la reacció final d'intensitat proporcional a la quantitat d'antigen que hi ha en la mostra (veure **figura 15**).

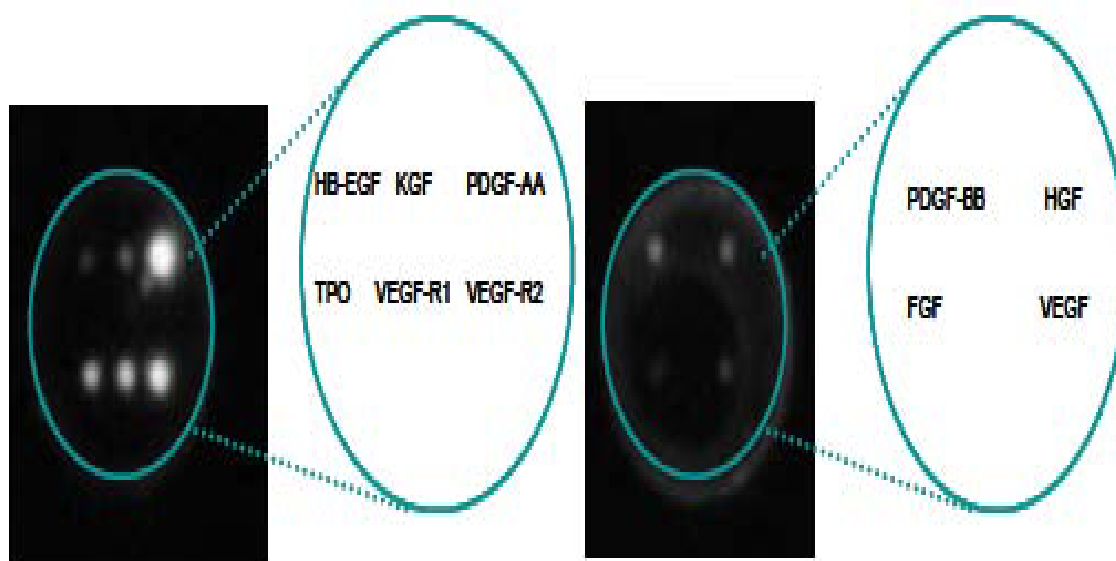
3. Es capta aquest senyal per una càmera freda (CCD, Aushon, USA).

4. Les imatges obtingudes s'analitzen amb el programa *Array Analyst* (Aushon, USA).

Els límits de sensibilitat eren d'1 pg/ml pel PDGF-BB, 3.1 pg/ml pel HGF, 2 pg/ml pel FGF i 4.9 pg/ml pel VEGF.

Cada mostra es va analitzar per duplicat i es va utilitzar la mitjana dels dos valors.

Figura 15: Imatge del senyal obtingut d'una mostra per diferents proteïnes amb el *Searchlight protein array* (adaptat de Navarro Sobrino, Tesi doctoral 2010 (253)).



3.3.2. Determinació del polimorfisme C1444T de la PCR

El DNA va ser extret de la sang total mitjançant mètodes estàndards. La regió 3' no traduïda del gen de la PCR, on es troba el polimorfisme C1444T, es va amplificar per reacció de la cadena de la polimerasa i seqüenciar seguint el mètode descrit per Brull i col·laboradors (310).

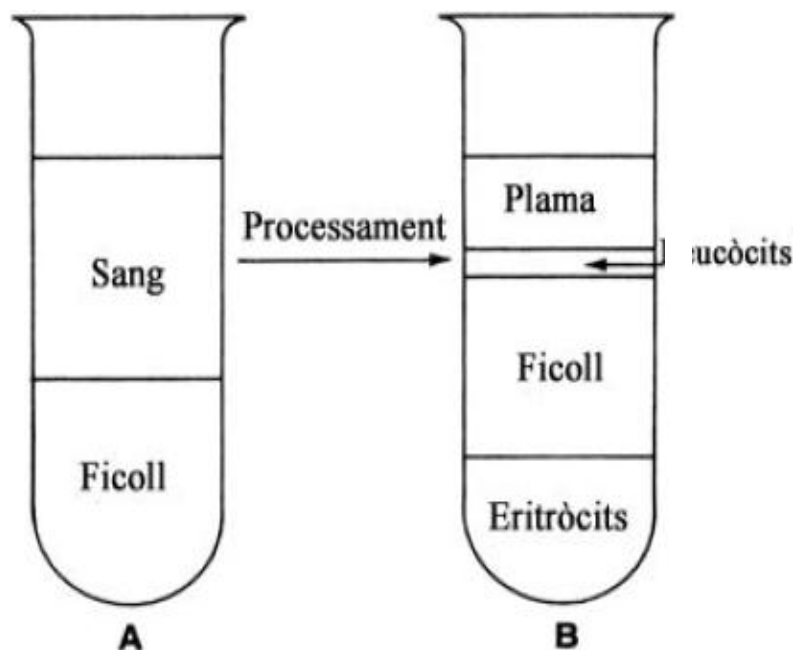
Breument, els passos següents van ser els següents:

1. Les mostres es van sotmetre a desnaturalització a 95°C durant 5 minuts, seguit d'una amplificació consistent en: 30 cicles de desnaturalització a 94° durant 1 minut, *annealing* a 55°C durant 30 segons i extensió a 72°C durant 1 minut, amb una extensió final a 72°C durant 5 mins., en un sistema GeneAmp® PCR System 2700.
2. Els amplicons van ser purificats amb el kit QIAquit PCR i sotmesos a un cicle de seqüenciació en el sistema GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster Cty, Calif., USA) amb un etiquetatge de terminadors BigDye® (Applied boshstems).
3. Finalment, les mostres van ser purificades amb columnes AutoSeq™ G-50 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J., USA) i analitzades en un seqüenciador ABI Prism® 310 DNA (Applied Biosystems) per determinar els genotips.

3.3.3. Determinació de les CPE (citometria de flux)

1. A partir de sang total es va aïllar la fracció mononuclear (MNC) pel mètode de Ficoll-Paque Plus™ (GE Healthcare, USA): a partir d'aproximadament 20 ml de sang total recollida en tubs amb EDTA, es diluïa la sang (1:1) en tampó fosfat salí (PBS) amb un 2% de sèrum fetal boví. Llavors, en tubs falcon de 15ml s'afegien 5.5ml de Ficoll a la part inferior i 8 ml de sang diluïda a la part superior, procurant no barrejar les dues fases. Se centrifugaven els tubs a 1400 rpm durant 30 min a TA i es recollia la capa de cèl·lules mononuclears que es transferia a un tub falcon de 50ml (veure **Figura 16**).

Figura 16. Esquema de l'aïllament de la fracció mononuclear de sang perifèrica pel mètode de Ficoll. **A.** abans del processament **B.** després del processament (adaptat de Navarro Sobrino, Tesi doctoral 2010 (253)).



2. Es centrifugava el tub durant 5 min a 1500 rpm a TA i es descartava el sobrenedant. Per lisar els eritròcits, s'afegien 6 ml de solució de lisi d'eritròcits (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0,115 mM EDTA), es barrejava per pipeteig durant 2 min i es centrifugava a 1500 rpm durant 5 min a TA. Les cèl·lules mononuclears es rentaven amb 5 ml de PBS, es centrifugaven a 1500 rpm durant 5 mins a TA i es descartava el sobrenedant.

3. A continuació s'afegien 200 µl de PBA, es barrejava i s'agafaven 15 µl de la dilució els quals es tenyien afegint 15 µl de Trypan blue per procedir al recompte de les cèl·lules mononuclears en una càmera Neubauer. Un cop feta l'estimació de les cèl·lules s'agafaven els mil·lilitres corresponents a 10⁶ leucòcits totals i s'afegia PBA fins a obtenir 500 µl de dilució.

4. Es procedia al marcatge de les CPE a TA durant 30 min protegit de la llum amb 20ul dels següents anticossos monoclonals marcats amb fluorocroms: 0.04ul/ml KDR-biotina (Sigma-Aldrich, MO, USA), 44ul/ul ExtrAvidin-PE, i 0.5ug/ml CD34-PErCP-cy5.5 (BD Biosciences).

5. Es centrifugaven les mostres a 1500 rpm durant 5 min a TA i es resuspenia el precipitat amb PBA (1% BSA, 0.1% azida sòdica en PBS) fins a un volum final d'1 ml. La mostra es filtrava a través de filtres estèrils de 30 µm (Partec, Alemanya) protegida de la llum.
6. Es va utilitzar un citòmetre de flux BD FACSCalibur (BD Bioscience) adquirint un mínim de 3×10^5 esdeveniments per cada mostra. Per controlar unions no específiques als anticossos també es van marcar les cèl·lules amb un anticòs fluorescent control d'isotip negatiu (PerCp-Cy, IgG-biotina i ExtrAvidin-PE).
7. Les cèl·lules progenitores es van definir com CD34+ i les CPE com cèl·lules CD34+/KDR+. Es va expressar la seva concentració com el nombre de cèl·lules per ml de sang analitzada. L'anàlisi es va realitzar amb el programa FCS ExpressTM versió 3 (De Novo software, USA).

Figura 17. Esquema del funcionament d'un citòmetre de flux. El làser incideix sobre la mostra i excita els fluorocroms que marquen les cèl·lules, la llum dispersada ens dóna informació sobre la mida i la granulositat del citoplasma cel·lular (monòcits, limfòcits o granulòcits) i la fluorescència sobre el marcatge específic de la població d'interès. (adaptat de Navarro Sobrino, Tesi doctoral 2010 (253))

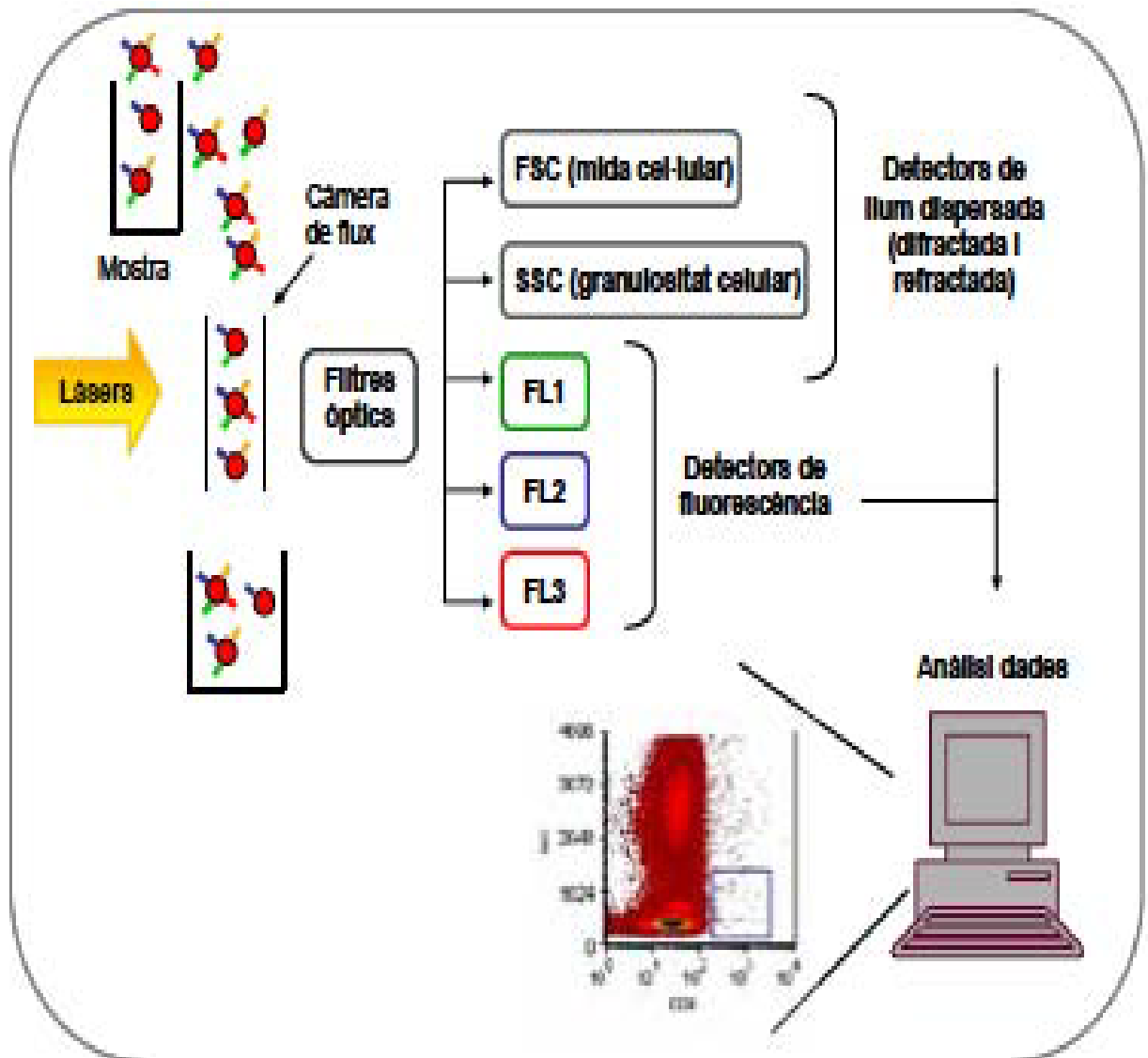
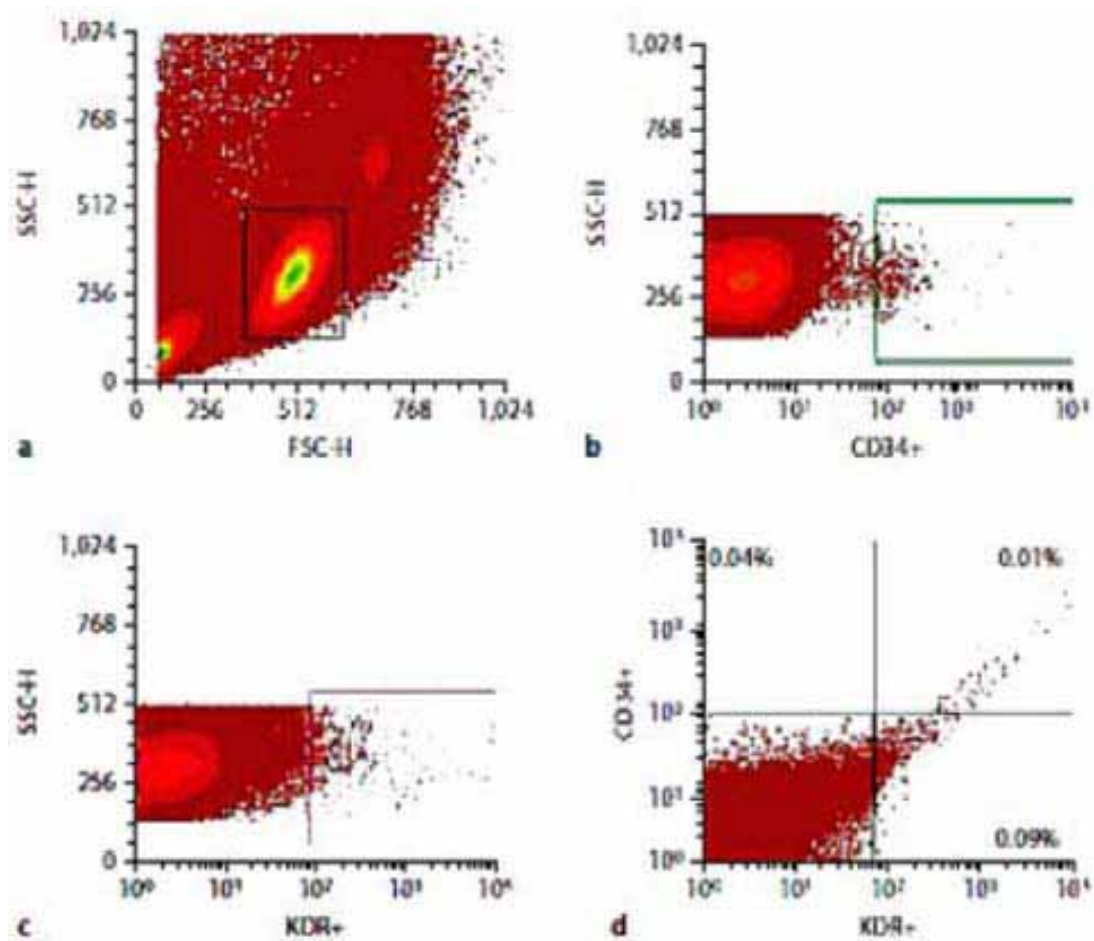


Figura 18. Anàlisi FACS de les cèl·lules. **a.** Gràfic que mostra la densitat de la població cel·lular segons la mida (FSC = *forward scatter*) i la granularitat cel·lular (SSC = *sideward scatter*). La finestra blava marca les poblacions seleccionades per analitzar **b.** cèl·lules CD34+ (finestra verda) **c.** cèl·lules KDR+ (finestra rosada) **d.** Gràfic de densitat final que mostra les cèl·lules KDR+CD34+ seleccionades per la seva quantificació (quadrant superior dret).



3.4. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programa SPSS 15.0. En cada estudi es detalla el tractament estadístic de les dades i els tests aplicats en cada cas.

En el quart article es va utilitzar software R (packages Hmisc and PredictABLE) per analitzar el percentatge de milloria predictiva i de reclassificació entre probabilitats categoritzades de risc de recurrència al afegir el biomarcador PAI-1 al model clínic ESRS mitjançant els mètodes estadístics *Integrated Discriminator Improvement (IDI)* i *Net Reclassification Index (NRI)* (310).

4. RESULTATS (COPIA DE LES PUBLICACIONS)

Article 1

C-Reactive Protein Gene C1444T Polymorphism and Risk of Recurrent Ischemic Events in Patients with Symptomatic Intracranial Atherostenoses.

Cerebrovasc Dis 2009;28:95–102

Article 2

Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease.

Atherosclerosis 2011;218:181-7

Article 3

Decreased levels of angiogenic factors in intracranial atherosclerotic disease despite severity-related increase in endothelial progenitor cell counts.

Cerebrovasc Dis Cerebrovasc Dis 2013;35:81–88

Article 4 (annex).

Predictive value of ankle-brisk and biomarkers in symptomatic intracranial atherosclerotic disease recurrence.

Submitted to Stroke, March 2013

C-Reactive Protein Gene C1444T Polymorphism and Risk of Recurrent Ischemic Events in Patients with Symptomatic Intracranial Atherostenoses

Juan F. Arenillas^e Andreu Massot^a Jose Alvarez-Sabín^a
Israel Fernandez-Cadenas^b Albert del Rio-Espinola^b Pilar Chacon^c
Manuel Quintana^b Carlos A. Molina^a Alex Rovira^d Joan Montaner^b

^aNeurovascular Unit and ^bNeurovascular Research Laboratory, Departments of Neurology and Internal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, ^cLipid Research Unit, Department of Biochemistry, ^dMagnetic Resonance Unit, Department of Neuroradiology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, and ^eStroke Unit, Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario, University of Valladolid, Valladolid, Spain

Key Words

Genetics · Polymorphism · Atherosclerosis · Intracranial stenosis · Stroke

Abstract

Background: High levels of C-reactive protein (CRP) are associated with an increased risk of further ischemic events in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease (ICAD). It remains unknown to which extent this increased risk might be genetically predetermined. We aimed to investigate the relationship between a common genetic polymorphism of the CRP gene and the risk of recurrent ischemic events in symptomatic ICAD patients. **Methods:** We studied 75 consecutive patients with a first-ever cerebral ischemic event attributable to symptomatic ICAD. Blood samples were drawn 3 months after the qualifying event. Genomic DNA was isolated and the C1444T single nucleotide polymorphism (SNP) of the CRP gene was determined. The blood concentration of CRP was also measured. Patients underwent long-term clinical follow-up to detect the occurrence of further major ischemic events. **Results:** During a

median follow-up time of 23 months, 18 patients (24%) suffered a major ischemic event (10 ischemic strokes, 3 transient ischemic attacks and 5 myocardial infarctions). Raised CRP levels at baseline ($p = 0.02$) and the presence of the T allele within the CRP C1444T SNP were associated with a higher risk of recurrent ischemic events ($p = 0.02$). Kaplan-Meier and multivariable Cox regression analyses adjusted for age, sex, vascular risk factors and CRP level identified that the presence of the T allele in the studied polymorphism predicted the occurrence of further ischemic events (hazard ratio 3.6, 95% confidence interval 1.2–11.1; $p = 0.025$). **Conclusions:** The presence of the T allele within the CRP gene C1444T polymorphism may be associated with a higher risk of further ischemic events in symptomatic ICAD patients.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Introduction

Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) is a major cause of ischemic stroke worldwide [1, 2]. Symptomatic ICAD is burdened with a high risk of stroke recurrence

despite the best available antithrombotic treatment [3]. Moreover, most recurrent events take place during the first weeks or months after the initial episode [3]. Therefore, there is a need to identify factors associated with a more aggressive course of the disease, which may help us discriminate those vulnerable patients who may benefit from the early instauration of more intensive preventive approaches. Among the factors that have already been described to be related to a worse prognosis for ICAD, the inflammatory marker C-reactive protein (CRP) may play a preeminent role [4, 5]. Previous studies have shown that CRP levels measured at a single time point after the acute phase of an initial ICAD-related ischemic episode predict both ICAD progression [4] and clinical recurrence [5]. Nevertheless, whether the increased recurrence risk related to CRP levels is genetically mediated remains unknown.

Family and twin studies suggest that CRP levels are influenced by genetic factors [6, 7]. Moreover, genetic variation within the CRP gene has been shown to be associated with CRP serum levels. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes within the human CRP gene locus have been associated both with CRP levels and with the risk of cardiovascular events including ischemic stroke [8–11]. One of the first SNPs to be described as potentially influencing CRP levels was the C1444T SNP, located in the 3' untranslated region of the CRP gene [12]. The presence of the T allele in the C1444T SNP has been associated with higher CRP concentrations in healthy individuals both in basal conditions and after intense exercise [12] or a moderate inflammatory stimulus [13]. We aimed to prospectively investigate the relationship between the CRP gene C1444T polymorphism and the risk of recurrent ischemic events in symptomatic ICAD patients.

Subjects and Methods

Patient Selection

The target group of this prospective longitudinal study consisted of consecutive patients with first-ever transient ischemic attack (TIA) or ischemic stroke and symptomatic intracranial atherostenoses detected by transcranial Doppler (TCD) and confirmed by magnetic resonance angiography (MRA) or computed tomography angiography (CTA). Between June 2001 and January 2004, 196 consecutive patients with TIA or ischemic stroke admitted to our Stroke Unit showed intracranial stenoses potentially responsible for the cerebral ischemic event on TCD recordings. Our diagnostic protocol during admission has been reported in detail elsewhere [14]. Of these 196 patients, 75 fulfilled all entry criteria and could be included in the study. All of these 75

patients had participated in a previous study by our group aimed at identifying biomarkers of inflammation and fibrinolysis associated with a higher risk of progression of symptomatic ICAD [4]. The reasons for excluding the remaining candidates were detailed in that publication and belong to the following categories: (1) presence of other potential causes of cerebral ischemia (n = 46), (2) nonatherosclerotic origin of intracranial stenoses (n = 23), (3) existence of conditions known to modify the levels of the studied molecules (n = 20) and (4) impossibility of performing follow-up due to stroke-related death or severe disability (n = 10), lack of an adequate acoustic window (n = 21) or denial of informed consent (n = 1). At the inclusion visit, which took place 3 months after the qualifying event, informed consent and blood samples were obtained from all 75 patients with symptomatic intracranial atherostenoses. This study was approved by the local ethics committee.

Diagnosis of Intracranial Atherostenoses

TCD recordings were performed using a Multi-Dop-X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz. We used a standard method of insonation through the temporal, occipital and orbital windows, as previously described [15]. According to validated criteria, intracranial stenoses were diagnosed if the mean blood flow velocity at a circumscribed insonation depth was >80 cm/s, with side-to-side differences >30 cm/s and signs of disturbed flow [16]. Coexistent extracranial internal carotid artery atherosclerosis was evaluated and categorized in our laboratory as previously described [14]. Finally, TCD-detected intracranial stenoses were confirmed during admission by MRA or by CTA when it was not possible to perform magnetic resonance imaging. Our MRA and CTA protocols have been described in detail previously [14]. Briefly, intracranial stenosis was defined as a focal narrowing of >50% luminal reduction affecting the main cerebral large arteries. Images were interpreted by the same neuroradiologist (A.R.), who was blinded to the sonographic data. The number of intracranial stenoses was recorded for further analysis.

Clinical Variables and Long-Term Follow-Up

Cigarette smoking and medical history of hypertension, hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus were recorded at the inclusion visit. Stroke severity was assessed using the maximum National Institutes of Health Stroke Scale score during admission. Functional status at day 90 was assessed by means of the modified Rankin scale score. Secondary prevention therapies were established following the recommendations of the American Heart Association guidelines available during the study period [17]. Antithrombotic treatment was indicated in an individualized manner following the criteria of the stroke team responsible for each patient. The use of acenocumarol, aspirin, clopidogrel, statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers was registered. After inclusion, clinical visits were conducted every 6 months by a stroke neurologist (J.F.A.) who remained unaware of the biochemical and genetic data of the patients throughout the study period. The following major vascular events were considered as predefined clinical end points: acute ischemic stroke; TIA diagnosed by a stroke neurologist; acute myocardial infarction or angina requiring hospitalization, and vascular death.

Table 1. Baseline characteristics of the study sample (n = 75)

Variable	
Age, years	66.2 ± 8.3
Males	55 (73)
Smokers	35 (47)
Hypertension	60 (80)
Diabetes mellitus	40 (53)
Hypercholesterolemia	55 (73)
Coronary heart disease	13 (17.5)
Peripheral arterial disease	15 (20)
>2 vascular risk factors	36 (48)
Qualifying event	
Stroke	54 (72)
TIA	21 (28)
Location of symptomatic intracranial stenosis	
Intracranial ICA	17 (23)
MCA	25 (33)
ACA	2 (3)
PCA	9 (12)
VB	14 (19)
Undetermined	8 (10)
Asymptomatic extracranial	
ICA >30% stenosis	28 (37)
90-day mRS score 0 or 1	62 (83)
Antithrombotic treatment	
Anticoagulants	17 (23)
Aspirin	26 (35)
Clopidogrel	43 (57)
Statins	53 (71)
ACEI	25 (33)
ARB	10 (13)
Hs-CRP, mg/l	3.6 (1.6–8.5)

Results are expressed as means ± standard deviation, numbers (percentage in parentheses) or medians (interquartile range in parentheses) as appropriate. ACA = Anterior cerebral artery; ACEI = angiotensin converting enzyme inhibitors; ARB = angiotensin receptor blocker; Hs = high sensitivity; ICA = internal carotid artery; MCA = middle cerebral artery; mRS = modified Rankin scale; PCA = posterior cerebral artery; VB = intracranial vertebral and basilar arteries.

Blood Sampling and CRP Level Determination

Blood samples were drawn at the inclusion visit, which took place 3 months after the qualifying ischemic event in order to avoid acute-phase changes, always after overnight fasting. Acute infections, surgery or trauma during the previous 3 months and incident neoplasm or inflammatory conditions were ruled out by a careful medical history and physical examination prior to sampling. Blood was allowed to clot at room temperature for 30 min. After centrifugation at 3,500 rpm and 4°C for 15 min, serum was blind coded and stored at -80°C until analyzed. High-sensitivity CRP levels were obtained with a Behring Nephelometer Analyzer and expressed in milligrams per liter. All determinations were

performed in duplicate, and the mean value of both determinations was used. The mean intra-assay coefficients of variation were <10% in all cases.

Determination of CRP C1444T Polymorphism

DNA was extracted from whole blood by standard methods. The 3' untranslated region of the CRP gene, where the C1444T polymorphism is located, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced according to the method described by Brull et al. [12]. Briefly, the samples were subjected to denaturation at 95°C for 5 min, followed by amplification consisting of 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min, in a GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). Amplicons were purified with the QIAquick PCR purification kit and subjected to cycle sequencing on the GeneAmp PCR System 2700 with BigDye®-labeled terminators (Applied Biosystems). Lastly, the samples were purified with AutoSeq™ G-50 columns (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J., USA) and analyzed in an ABI Prism® 310 DNA sequencer (Applied Biosystems) in order to determine the genotypes.

Statistical Analysis

Analyses were performed with the SPSS statistical package (Chicago, Ill., USA), version 12.0. Statistical significance for intergroup differences was assessed by the χ^2 test or Fisher's exact test for categorical variables and by the Mann-Whitney U test for continuous variables. CRP levels were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test). The χ^2 test was used to determine whether there was any significant difference in allelic or genotype frequencies between ICAD patients with or without recurrent ischemic events. The presence of Hardy-Weinberg equilibrium for the C1444T polymorphism was also examined by the χ^2 test. To prevent overmodeling of the data and false-positive results, only clinical recurrence was considered an end point of the study. Univariate analyses were performed to detect variables associated with the occurrence of further ischemic events. For CRP levels, a receiver operating characteristic curve was configured to establish the cutoff point that optimally predicted clinical recurrence. A Cox proportional hazards multivariate analysis was used to identify predictors of further ischemic events during follow-up, in which age, sex, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and variables showing p values <0.05 on univariate testing were included. Results were expressed as adjusted hazard ratios and corresponding 95% confidence intervals. Finally, the relationship between CRP C1444T polymorphism genotypes and the occurrence of a clinical end point was evaluated by means of a Kaplan-Meier curve (log-rank test). A p value <0.05 was considered significant.

Results

Baseline Variables

Baseline characteristics and the risk factor profile of the study population are shown in table 1. The study sample consisted of 55 men (73%) and 20 women (27%).

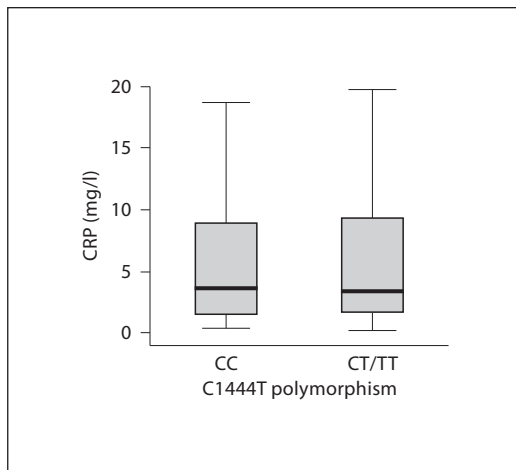


Fig. 1. Box plot showing the relationship between CRP C1444T SNP genotype distribution and CRP level ($p = 0.7$). Patients were categorized according to the presence or absence of the T allele.

Mean age was 66.2 ± 8.3 years. The qualifying event attributable to a symptomatic intracranial atherostenosis was an ischemic stroke in 54 patients (72%) and a TIA in the remaining 21 (28%). The symptomatic lesion was located in the intracranial internal carotid artery in 17 patients (23%), in the middle cerebral artery in 25 (33%), in the anterior cerebral artery in 2 (3%), in the posterior cerebral artery in 9 (12%) and in the vertebrobasilar system in 14 (19%). In 8 patients with multiple stenoses presenting with a TIA, it was not possible to determine which intracranial stenosis had been symptomatic. Very early recurrence during admission was observed in 26 patients; ischemic strokes were preceded by a TIA in 12 patients, and 14 patients presented with repeated TIAs. For stroke patients, the median National Institutes of Health Stroke Scale score on admission was 2 (interquartile range 0–4). All studied subjects remained free of ischemic events during the period between hospital discharge and the inclusion visit. Regarding secondary prevention therapies, 58 patients (77%) received antiplatelet agents, 17 (23%) received oral anticoagulants and 53 (71%) were treated with statins throughout the follow-up period. Intracranial stenoses were confirmed by MRA in 66 patients (88%) and by CTA in 9 (12%). The locations of the culprit stenoses are indicated in table 1. Besides the 75 symptomatic stenoses, a total of 165 coexistent asymptomatic stenoses were detected. The median number of intracranial stenoses per patient was 3 (interquartile range 2–4).

Table 2. Occurrence of new major vascular events: univariate analysis

Variable	No vascular event (n = 57)	Vascular event (n = 18)	p
Age, years	66.2 ± 7.8	66.4 ± 10.3	0.920
Males	40 (70)	15 (83)	0.271
Smokers	25 (44)	10 (56)	0.386
Hypertension	43 (75)	17 (94)	0.079
Diabetes mellitus	30 (53)	10 (56)	0.828
Hypercholesterolemia	42 (74)	13 (72)	0.903
>2 risk factors	25 (44)	11 (61)	0.202
Coronary heart disease	8 (14)	5 (27.8)	0.132
Peripheral arterial disease	9 (15.8)	6 (33.3)	0.105
Initial stroke vs. TIA	41 (72)	13 (72)	0.849
Number of intracranial stenoses	3.1 ± 1.6	3.5 ± 2.0	0.514
Extracranial >30% stenosis	21 (37)	7 (39)	0.876
Aspirin vs. other antithrombotic treatment	16 (28)	8 (44)	0.194
Hs-CRP, mg/l	3.3 (1.5–5.8)	6.8 (1.6–18.9)	0.084
CRP >4.9 mg/l	17 (30)	11 (61)	0.017
CRP C1444T T allele carriers (CT/TT)	26 (48)	14 (78)	0.028

Univariate analysis of variables associated with the occurrence of new major ischemic events during follow-up. Results are expressed as means \pm standard deviation, numbers (percentage in parentheses) or medians (interquartile range in parentheses) as appropriate. Hs = High sensitivity.

C1444T SNP Distribution

The distribution of genotypes within the CRP gene C1444T SNP was as follows: 44% of patients were wild-type homozygous (C1444C), 43% were heterozygous (C1444T) and 13% were homozygous for the T allele (T1444T). This genotype distribution was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. No significant associations were observed between SNP distribution and circulating CRP levels, as shown in figure 1.

Predictors of New Major Vascular Events

During a median follow-up time of 23 months (interquartile range 17–29), 18 patients (24%) suffered a major ischemic event, categorized as follows: 10 ischemic strokes, 3 TIAs and 5 myocardial infarctions. Of these major ischemic events, 9 (50%) occurred within the first 5 months after inclusion and only 4 took place after the first year of follow-up. All recurrent cerebral ischemic events were attributable to intracranial atherostenoses,

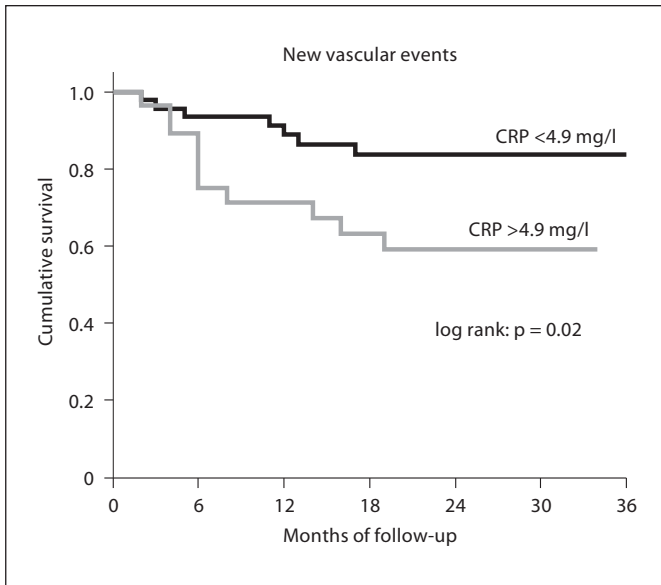


Fig. 2. Kaplan-Meier curve illustrating how a significantly lower proportion of patients with a baseline CRP level >4.9 mg/l remained free of new ischemic events during follow-up ($p = 0.02$, log-rank test), as compared with the group with CRP <4.9 mg/l.

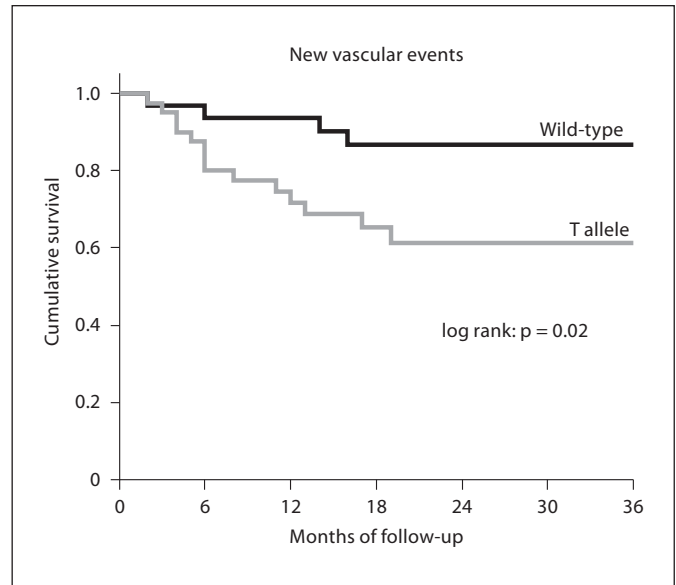


Fig. 3. Kaplan-Meier curve showing how the presence of the T allele within the CRP C1444T polymorphism was associated with a significantly lower cumulative survival free of new major events ($p = 0.02$, log-rank test).

located as follows: in the intracranial internal carotid artery in 5 patients, in the middle cerebral artery in 5, in the basilar artery in 2 and in the posterior cerebral artery in 1. Three patients died during follow-up, 2 due to fatal strokes and 1 due to cancer. As shown in table 2, univariate analysis identified CRP levels higher than 4.9 mg/l and the presence of the T allele within the CRP C1444T SNP as being significantly associated with a higher risk of recurrent ischemic events, while an almost significant trend was observed for arterial hypertension. When considering only the 13 recurrent cerebral ischemic events, 10 of them occurred in patients carrying the T allele within the studied SNP ($p = 0.07$).

In line with these findings, survival analyses showed that the risk of new vascular events was higher in patients with raised baseline CRP levels (fig. 2), as well as among CRP C1444T T allele carriers (fig. 3). Interestingly, when these 2 variables were combined, they appeared to have a synergistic effect in terms of increasing recurrence risk. As shown in figure 4, the risk of major ischemic events during follow-up was highest among patients with both high baseline CRP levels and the presence of the T allele within the CRP SNP. Finally, a multivariable Cox regression model was applied to assess the predictive capacity of CRP C1444T distribution. Presence of the T allele

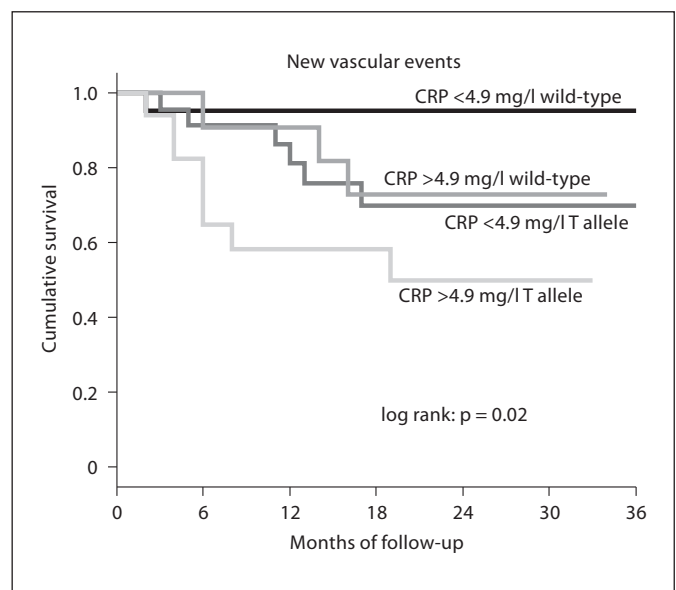


Fig. 4. Survival analysis combining CRP level and CRP genotype. Among the 4 resultant categories, the subgroup of patients with both higher baseline CRP levels and the presence of the T allele within the CRP C1444T SNP showed the lowest rate of survival free of new ischemic events during follow-up ($p = 0.02$, log-rank test). Of note, in this subgroup of patients, survival free of recurrent events decreased rapidly and markedly in the early follow-up period after the initial episode.

within the studied CRP SNP emerged as a predictor of major vascular events during follow-up, after adjustment for age, sex, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and baseline CRP level (hazard ratio 3.6, 95% confidence interval 1.2–11.1; $p = 0.025$).

Discussion

The major finding of this prospective study was that the presence of a common polymorphism within the CRP gene was associated with an increased risk of further major vascular events in patients with symptomatic ICAD, this association being independent of classical vascular risk factors and CRP level. This observation supports the hypothesis that part of the increased recurrence risk attributed to circulating CRP in ICAD patients [4, 5] may be genetically mediated. The clinical management of ICAD patients after their first ischemic event represents a challenge for stroke neurologists, given the high recurrence risk observed despite the best antithrombotic treatment [3]. During the current decade, a growing number of factors that characterize the highest-risk ICAD patients have been described, which can be divided into 2 main categories. Firstly, there are those local factors that confer vulnerability to the intracranial atherosclerotic plaque itself, such as the severity of the symptomatic stenosis [18]. Secondly, there are systemic factors that render the patient more prone to suffer the complications of ICAD in the near future, such as inflammation [5] and metabolic syndrome [19]. Inside this second group of factors, interindividual genetic variation may play an important and yet insufficiently explored role, as suggested by our study. Thus, genetic factors, such as the presence of the T allele within the C1444T CRP gene SNP, may also need to be considered among the prognostic determinants of symptomatic ICAD.

The real significance of the marked association observed between the studied SNP and the risk of new major vascular events in ICAD patients is not fully clear. Our study design, formulated after the association between the C1444T SNP and CRP levels was first published [12], assumed that the polymorphism under investigation could directly affect the expression of the genotype or was in linkage disequilibrium with other polymorphisms or groups of polymorphisms responsible for a relevant proportion of the phenotype. In this context, the C1444T SNP, located in an untranslated region of the CRP gene, either has a direct functional role or more probably is in linkage disequilibrium with other genetic variants really

responsible for the association between the CRP genotype and recurrent vascular events [12]. However, it is likely that specific SNPs at a candidate gene locus represent only part of the overall genetic variation that may contribute to phenotypic variation. Accordingly, more recent studies attempting to evaluate the relationship between the CRP gene, CRP levels and cardiovascular risk employ genetic variation techniques such as haplotype mapping, which are able to capture most of the genetic diversity in a sample [8, 9, 20, 21]. Therefore, our preliminary results may need to be replicated with screening of the whole CRP gene using tag SNPs and also analyzing the haplotypes of the gene.

In our study, both CRP level and CRP genotype emerged as independent predictors of increased recurrence risk. However, the a priori expected association between the CRP C1444T SNP and CRP concentrations was not found. Thus, in our sample, the relationship between the studied SNP and recurrence risk in ICAD patients seemed not to be influenced by CRP levels. This apparently contradictory finding is in line with the results of the Cardiovascular Health Study, where the hazard ratio of new vascular events for CRP genotype was only slightly attenuated after adjustment for CRP level [9]. In contrast, CRP genotype was more strongly associated with plasma CRP concentration than with the risk of myocardial infarction or stroke in the Physicians' Health Study, the Framingham Heart Study and the Rotterdam Study [20, 22]. We propose several possible explanations for these discrepant observations. Firstly, the proportion of CRP level variation explained by environmental and clinical variables may be higher than the proportion of variation attributable to CRP SNPs, as suggested by previous studies [9, 21]. Secondly, if inflammation plays a causal role in the development of ICAD, circulating CRP measured at a single time point may not adequately reflect an individual's cumulative inflammatory burden. Moreover, it is known that there is significant intraindividual and analytical variability in CRP levels. Thirdly, not only the basal CRP level may be relevant in terms of determining future vascular risk, but also how the CRP concentration increases in response to an acute stimulus. In this setting, genetic variation within the CRP gene may influence both basal and stimulated CRP levels [13, 23]. Fourthly, the C1444T SNP might be associated with an increase in CRP activity related to changes in protein structure and conformation without necessarily affecting CRP levels. Fifthly, it remains remotely possible that the genetic variant responsible for the association between CRP genotype and vas-

cular events lies outside the CRP gene locus and that the observed association is not mediated by CRP levels [9]. Our study design, based on a single basal CRP measurement and a specific SNP determination, precludes the assessment of how the above-mentioned factors impact on the complex relationship between CRP genotype, CRP level and the risk of future ischemic events in ICAD patients. Finally, an additional major limitation of our study is the small sample size, which was related to our strict, predefined selection criteria, and which may represent a difficulty in trying to replicate our results in other populations.

In conclusion, the T allele of the CRP gene C1444T polymorphism may be associated with a higher risk of further ischemic events in symptomatic ICAD patients. This finding suggests that a genetic background may underlie, in part, the relationship between CRP levels and the increased risk of recurrent events in symptomatic ICAD. However, given the low number of patients studied, this observation could be a result of chance.

Therefore, our results should be cautiously interpreted as preliminary and need to be confirmed in a larger series of patients using more refined genetic variation techniques aimed at identifying CRP gene haplotypes. Genetic research represents a promising tool for ICAD patients both in the assessment of recurrence risk and in the search for new molecular targets for preventive therapy.

Acknowledgements

Dr. Juan F. Arenillas was the recipient of a research contract from the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Health), cofinanced by the Private Foundation of the Spanish Society of Neurology.

This study was funded by grants from the Spanish Ministry of Health (FIS 040438), the Spanish Society of Atherosclerosis (Beca SEA/FEA 2004) and the Spanish stroke research network RETICS-RD06/0026 (RENEVAS).

References

- Sacco R, 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.
- Wong KS, Huang YN, Gao S, Lam WWM, Chan YL, Kay R: Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology* 1998;50:812–813.
- 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.
- Arenillas JF, Álvarez-Sabin J, Molina CA, Chacón P, Fernández-Cadenas I, Ribó 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.
- Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina C, Chacón P, Rovira A, Montaner J, Ibarra B, Quintana M: C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever TIA and stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* 2003;34:2463–2470.
- Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP: Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001;154:681–689.
- MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, Pepys MB: Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem* 2004;50:130–134.
- Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M, Liu K, Williams OD, Iribarren C, Lewis EC, Fornage M, Boerwinkle E, Gross M, Jaquish C, Nickerson DA, Myers RM, Siscovick DS, Reiner AP: Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet* 2005;77:64–77.
- Lange LA, Carlson CS, Hindorf LA, Lange EM, Walston J, Durda JP, Cushman M, Bis JC, Zeng D, Lin D, Kuller LH, Nickerson DA, Psaty BM, Tracy RP, Reiner AP: Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA* 2006;296:2703–2711.
- Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RYL: Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis* 2005;178:139–145.
- Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, Nilsson S, Jern C, Ladenvall P: Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke* 2006;37:2018–2223.
- Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GD, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD: Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2063–2069.
- D'Aiuto F, Casas JP, Shah T, Humphries SE, Hingorani AD, Tonetti MS: C-reactive protein (+1444C>T) polymorphism influences CRP response following a moderate inflammatory stimulus. *Atherosclerosis* 2005;179:413–417.
- Arenillas JF, Molina CA, Chacón P, Rovira A, Montaner J, Coscojuela P, Sánchez E, Quintana M, Álvarez-Sabín J: High lipoprotein (a), diabetes and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology* 2004;63:27–32.
- Lindgaard KF, Bakke SJ, Aaslid R, Nornes H: Doppler diagnosis of intracranial occlusive disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49:510–518.
- Ley-Pozo J, Ringelstein EB: Noninvasive detection of occlusive disease of the carotid siphon and middle cerebral artery. *Ann Neurol* 1990;28:640–647.

- 17 Wolf PA, Clagett GP, Easton JD, Goldstein LB, Gorelick PB, Kelly-Hayes M, Sacco RL, Whisnant JP: Preventing ischemic stroke in patients with prior stroke and transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 1999; 30:1991–1994.
- 18 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.
- 19 Ovbiagele B, Saver JL, Lynn MJ, Chimowitz M; WASID Study Group: Impact of metabolic syndrome on prognosis of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology* 2006; 66:1344–1349.
- 20 Miller DT, Zee RY, Suk Danik J, Kozlowski P, Chasman DI, Lazarus R, Cook NR, Ridker PM, Kwiatkowski DJ: Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet* 2005;69:623–638.
- 21 Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, Guo CY, Gona P, Keaney JF Jr, Wilson PW, Newton-Cheh C, Musone SL, Camargo AL, Drake JA, Levy D, O'Donnell CJ, Hirschhorn JN, Benjamin EJ: Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation* 2006;113:1415–1423.
- 22 Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, Hofman A, Witteman JC: C-reactive protein gene haplotypes and risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2006;27:1331–1337.
- 23 Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, Miller DT, Zee RY, Kozlowski P, Kwiatkowski DJ, Ridker PM: Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia. *Ann Hum Genet* 2006; 70:705–716.



Lipoprotein-associated phospholipase A₂ testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease

Andreu Massot^a, Dolors Pelegri^b, Anna Penalba^a, Juan Arenillas^c, Cristina Boada^a, Dolors Giralt^a, Marc Ribó^d, Carlos A. Molina^d, Anna Rosell^a, José Alvarez-Sabín^d, Pilar Chacón^e, Alex Rovira^f, Pilar Delgado^a, Joan Montaner^{a,d,*}

^a Neurovascular Research Laboratory, Department of Neurology, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain

^b Clinical Biochemistry Unit, Department of Biochemistry, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain

^c Neurovascular Unit, Stroke Unit and Neurology Department, Hospital Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain

^d Neurovascular Unit, Department of Neurology, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain

^e Lipid Research Unit, Department of Biochemistry, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain

^f Magnetic Resonance Unit, Department of Neuroradiology, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 December 2010

Received in revised form 14 April 2011

Accepted 21 April 2011

Available online 5 May 2011

Key words:

Intracranial atherosclerosis

Intracranial stenoses

Lipoprotein-associated phospholipase A₂

Lp-PLA₂

Cardiovascular recurrence risk

Stroke recurrence risk

ABSTRACT

Background and purpose: Circulating lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) has emerged as a novel biomarker for cardiovascular diseases. Our aim was to determine Lp-PLA₂ mass and activity in a selected cohort of first-ever transient ischemic attack (TIA) or ischemic stroke patients with intracranial atherosclerotic disease (ICAD) and to investigate its relationship with the presence of classical vascular risk factors, response to secondary prevention treatments and risk of recurrent vascular events.

Methods: Lp-PLA₂ mass and activity were measured 3 months after TIA or stroke by means of the PLAC test and CAM-assay (diaDexus, Inc.) respectively in 75 patients. Classic vascular risk factors, preventive treatments and clinical characteristics at the time of the index event were recorded. Follow-up transcranial Doppler ultrasonography (TCD) was performed and the presence of a new vascular event was assessed every 6 months.

Results: Several preventive treatments (statins and clopidogrel) were significantly associated with lower Lp-PLA₂ mass and activity. During follow-up (median time 23 months), eighteen patients (24%) suffered a new vascular event. Baseline factors associated with new vascular events were: history of coronary artery disease, number of intracranial stenoses detected by TCD and also Lp-PLA₂ activity, which was the only independent predictor for new vascular events (hazard ratio 2.89; 95% CI 1.029 to 8.096; $p=0.044$) after multivariate analysis (Cox regression).

Conclusions: Lp-PLA₂ activity might be a useful tool to identify intracranial large-artery occlusive disease patients at higher risk of suffering new vascular events.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) is an important cause of stroke worldwide being responsible of about 8% of strokes in Caucasian population and as far as one third of Chinese population strokes [1,2]. Almost a quarter (22%) of these patients will suffer other ischemic events over the next 2 years despite the best preventive treatments [3], a risk that has been related to the progression of intracranial stenoses [4].

This unacceptable prognosis could be improved through the identification of higher risk patients who could benefit from a more intensive preventive approach. In this regard, some inflammatory biomarkers such as C-reactive protein (CRP) have shown the ability to predict future cardiovascular events, ischemic stroke and progression of symptomatic ICAD [5,6].

Similarly, lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) has emerged as a novel cardiovascular risk marker which activity seems to be stable over time [7] and unaffected by systemic inflammatory stimulus [8].

Lp-PLA₂ is a calcium-independent phospholipase derived especially from macrophages, that circulates mainly bound to low density lipoproteins (LDL) in plasma and is responsible of LDL metabolism, producing two pro-inflammatory mediators such as lysophosphatidylcholine (lysoPC) and oxidized nonesterified fatty acids (oxNEFAs), which are able to activate inflammatory path-

* Corresponding author at: Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, VHIR, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona. Pg. Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934894029; fax: +34 934894102.

E-mail address: 31862jmv@comb.cat (J. Montaner).

ways and elicit proatherogenic effects in endothelial cells, T cells, neutrophils and smooth muscle cells [9].

High levels of peripheral blood Lp-PLA₂ mass and activity are associated with an increased risk of coronary heart disease (CHD) and stroke [10,11] and their measurement improve stroke and cardiovascular risk stratification [12]. For that reason, US Food and Drug Administration approved Lp-PLA₂ evaluation for stroke and coronary disease risk.

However, as far as we know, the relationship between Lp-PLA₂ and vascular recurrence has not been yet evaluated in the specific high risk subgroup of strokes caused by intracranial atherosclerotic disease.

Our aim was to investigate the association between Lp-PLA₂ mass and activity with the recurrence of ischemic events in symptomatic ICAD patients and its relationship to secondary prevention treatments, classical vascular risk factors and intracranial stenoses progression.

2. Subjects and methods

2.1. Study participants

Our study population were selected among 196 consecutive patients with transient ischemic attack (TIA) or ischemic stroke admitted to our stroke unit with intracranial stenoses recorded by transcranial Doppler (TCD) potentially responsible for the cerebral ischemic event.

Our diagnostic protocol during admission has been reported in detail elsewhere [13].

This study included 75 consecutive patients with angiographic confirmed intracranial stenoses by MR-angiography or CT-angiography. The remaining candidates were excluded because of the following list of reasons: (1) presence of other potential causes of cerebral ischemia ($n=46$), (2) non-atherosclerotic origin of intracranial stenoses ($n=23$), (3) existence of inflammatory conditions ($n=20$) and (4) impossibility of performing follow-up due to stroke-related death or severe disability ($n=10$), lack of an adequate acoustic window ($n=21$) or denial of informed consent ($n=1$) (Fig. 1). The inclusion visit took place at least 3 months after the qualifying event and at that moment an informed consent and blood samples, always after overnight fast, were obtained from all 75 patients. Furthermore, acute infections, surgery or trauma during the previous 3 months and incident neoplasm or inflammatory conditions were ruled out by a careful medical history and physical examination prior to sampling.

This study was approved by the local ethics committee.

2.2. Clinical variables and long-term follow-up

2.2.1. Vascular risk factors and clinical variables

Cigarette smoking and medical history of hypertension, hypercholesterolemia, type 2 diabetes mellitus, diagnosed coronary artery disease and intermittent claudication were recorded at the inclusion visit, as previously described [14].

Stroke severity was assessed using the maximum National Institutes of Health Stroke Scale score (NIHSS) during admission and functional status at day 90 was assessed by means of the modified Rankin scale score (mRS). Secondary prevention therapies were established following the recommendations of the American Heart Association guidelines available during the study period and antithrombotic treatment was indicated in an individualized manner following the criteria of the stroke team responsible for each patient. The use of acenocumarol, aspirin, clopidogrel, statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers was registered.

After inclusion, clinical visits every 6 months were conducted by a stroke neurologist (J.F.A.) who remained unaware of the biochemical data of the patients throughout the study period. The following major vascular events were considered as predefined clinical end points: acute ischemic stroke; TIA diagnosed by a stroke neurologist; acute myocardial infarction or angina requiring hospitalisation, and vascular death.

2.3. Ultrasound protocol

TCD recordings were performed using a Multi-Dop-X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH, Germany) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz. We used a standard method of insonation through the temporal, occipital, and orbital windows without compression testing. According to validated criteria, intracranial stenoses were diagnosed if the mean blood flow velocity at a circumscribed insonation depth was >80 cm/s, with side-to-side differences of >30 cm/s and signs of disturbed flow. TCD examinations were carried out on admission and repeated at the inclusion visit to confirm the persistence of stenoses.

Baseline cervical internal carotid artery (ICA) atherosclerosis was categorized as absent; mild, if one or both ICAs had a mild $<50\%$ stenoses; moderate, when any of the ICAs presented a moderate $<70\%$ stenoses; and severe, if any ICA had a severe asymptomatic stenoses.

2.4. MRA and CTA

MRA was performed with a 1.5T whole-body imager system with 24-mT/m gradient strength, 300-ms rise time, and an echoplanar-capable receiver equipped with a gradient overdrive (Magnetom Vision Plus; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany). We used a three-dimensional time-offlight sequence with magnetization transfer suppression and tilted optimized non-saturating excitation, using 1.5-mm-thick sections, 200-mm field of view, 200×512 matrix, and acquisition time that ranged from 7 to 11 min. Maximal intensity projection (MIP) reconstructions were performed at the time of imaging.

The data were reconstructed around the head-to-foot axis and right-to-left axis. If necessary, target MIP reconstructions were performed. MRAs were analyzed by a neuroradiologist who was blind to sonographic and biochemical data and confirmed the presence of intracranial stenoses.

CTAs were performed on a multislice MX8000 Philips spiral CT scanner (Best, the Netherlands) with four rows of detectors.

Ninety milliliters of iodinated contrast medium (320 mg/ml) was administered IV at a rate of 3 ml/s with a 13-s prescan delay. Scanning began at the cranial base and continued cranially for 80 mm. Total acquisition time average was 22 s. Raw data were transferred to a workstation, and MIP reconstructions were obtained. Images were interpreted by a neuroradiologist who identified the presence of intracranial stenoses.

The number of angiographically confirmed intracranial stenoses in every patient was used to assess the extent of intracranial large-artery occlusive disease on baseline.

2.5. Lp-PLA₂ mass and activity determinations

Peripheral blood samples were collected in EDTA-containing tubes and plasma was extracted after 15 min centrifugation (3500 rpm), blind coded and then frozen at -80°C until testing was performed.

Lp-PLA₂ mass (PLAC Test, diaDexus Inc.) was assayed using a turbidimetric immunoassay on an automated clinical chemistry analyzer (Olympus AU 2700). Intra-assay coefficient of variation

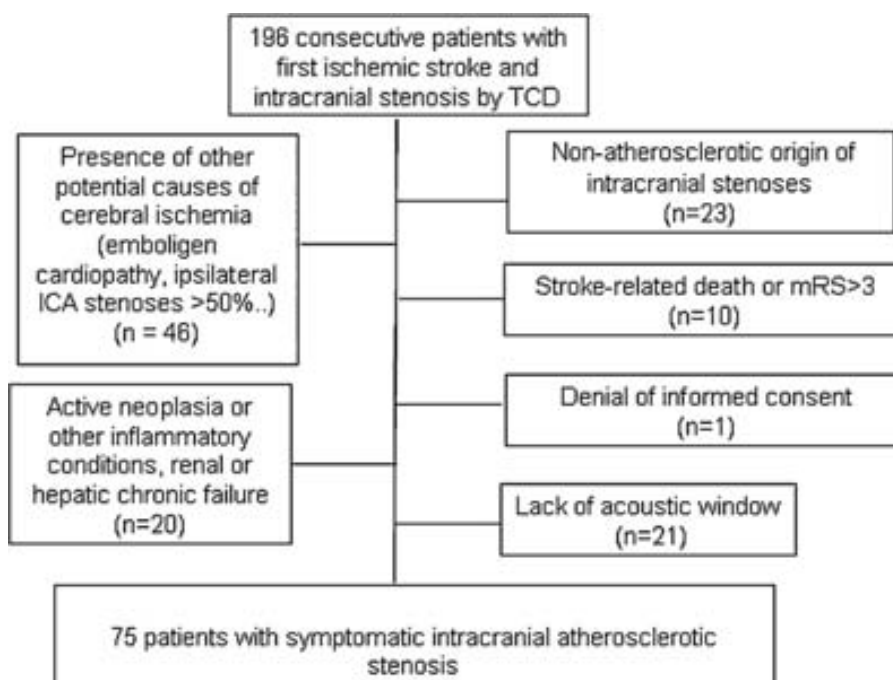


Fig. 1. Description of the study population.

(CV) was determined testing 20 replicates of one human serum sample (CV 1.6%) and 20 replicates of two buffer controls (CV 1.8%) with Lp-PLA₂ at the lowest and highest concentrations. Inter-assay variation was performed during five consecutive days in duplicates for the buffer controls, with values lower than 6.9%. Since our intra and inter-assay variation was low, samples were analyzed by single measurements.

Lp-PLA₂ activity was measured with a colorimetric activity method in a 96-well microplate format (Lp-PLA₂ CAM, diaDexus Inc.), which measures a linear kinetic rate over time. All samples were tested in duplicates, and the coefficient of variation was <20%.

All assays were performed blinded to clinical data.

2.6. Statistical analysis

Analyses were performed with the SPSS statistical package (Chicago, Ill., USA), version 15.0. Statistical significance for inter-group differences was assessed by the χ^2 -test or Fisher's exact test for categorical variables and by the Mann-Whitney *U*- and *t*-test for continuous variables, as appropriate.

Cumulative event-free rates for the time to a recurrent vascular event were estimated by the Kaplan–Meier product limit method, and patients with Lp-PLA₂ mass and activity across quartiles were compared by the log-rank test. Time to recurrent vascular event was analyzed with censoring at the time to either non-vascular death or last follow up.

To prevent overmodeling of the data and false-positive results, only clinical recurrence was considered an end point of the study.

Also, a receiver operating characteristic (ROC) curve was performed to identify an optimal cut-off point of Lp-PLA₂ activity that best discriminate between the presence or absence of a new recurrent event.

A Cox proportional hazards multivariate analysis was constructed to identify potential predictors of further vascular events during follow-up, after adjustment for potential confounders such as age, gender, hypertension, diabetes, dyslipidemia and LDL levels. Results were expressed as adjusted hazard ratios and corresponding 95% confidence intervals.

3. Results

3.1. Baseline clinical variables

Baseline characteristics and vascular risk factors of the study population are shown in Table 1. The study sample comprised 55 men (73%) and 20 women (27%). The mean age was 66.2 ± 8.3 years. The qualifying event attributable to a symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis was an ischemic stroke in 54 patients (72%) and a TIA in the remaining 21 (28%). Location of symptomatic intracranial stenosis was recorded; as shown in Table 1, the middle cerebral artery the most affected arterial segment. In 8 patients with multiple stenoses presenting with a TIA, it was not possible to determine which intracranial stenoses had been symptomatic. For stroke patients, the median NIHSS on admission was 2 (interquartile range 0–4). All studied subjects remained free of ischemic events during the period between hospital discharge and the inclusion visit. Regarding secondary prevention therapies, 58 patients (77%) received antiplatelet agents, 17 (23%) received oral anticoagulants and 53 (71%) were treated with statins throughout the follow-up period.

Intracranial stenoses were confirmed by MRA in 66 patients (88%) and by CTA in 9 (12%). Besides the 75 symptomatic stenoses, a total of 165 coexistent asymptomatic stenoses were detected, three being the median number of diagnosed intracranial stenoses per patient (interquartile range 2–4).

3.2. Lp-PLA₂ mass and activity, cardiovascular risk factors and clinical evaluation

Lp-PLA₂ mass was normally distributed (313 ± 100 ng/ml) whereas activity was not [153 (interquartile range: 127–177 nmol/ml/min)], and both were mildly correlated ($r = 0.197$; $p = 0.004$).

Table 2 shows univariate analysis concerning Lp-PLA₂ mass and activity. Several factors were significantly associated with either Lp-PLA₂ mass and/or activity, such as gender, LDL-cholesterol level and baseline vascular status as determined by TCD. Neither Lp-PLA₂

Table 1
Baseline characteristics of the study sample (n = 75).

Characteristic	Value
Demographic characteristics	
Age, years	66.2 ± 8.3
Gender, male	55 (73%)
Risk factors and comorbid vascular diseases	
Current smoking	35 (47%)
Hypertension	60 (80%)
Diabetes mellitus	40 (53%)
Hypercholesterolemia	55 (73%)
Coronary heart disease	13 (17.5%)
Peripheral arterial disease	15 (20%)
>2 vascular risk factors	36 (48%)
Qualifying event	
• Stroke	54 (72%)
• TIA	21 (28%)
Location of symptomatic intracranial stenosis	
• Intracranial ICA	17 (23%)
• MCA	25 (33%)
• ACA	2 (3%)
• PCA	9 (12%)
• VB	14 (19%)
• Undetermined	8 (10%)
Asymptomatic extracranial	
• ICA > 30% stenosis	28 (37%)
Anti-thrombotic treatment	
• Anticoagulants	17 (23%)
• Aspirin	26 (35%)
• Clopidogrel	43 (57%)
Statins	
ACEI	25 (33%)
ARB	10 (13%)
Lp-PLA ₂ mass (ng/ml)	287 (232–396)
Lp-PLA ₂ activity (nmol/ml/min)	152 (127–176)

Results are expressed as means ± standard deviation, n (percentage) or medians (interquartile range) as appropriate. ACA = anterior cerebral artery; ACEI = angiotensin converting enzyme inhibitors; ARB = angiotensin receptor blocker; ICA = internal carotid artery; MCA = middle cerebral artery; mRS = modified Rankin scale; PCA = posterior cerebral artery; VB = intracranial vertebral and basilar arteries.

mass nor activity were associated with the amount of vascular risk factors.

Noteworthy, ICAD progression assessed by ultrasonographic studies during follow-up visits, was not associated with either Lp-PLA₂ mass or activity, as measured at the time of inclusion into the study.

As expected, significant correlations were found between Lp-PLA₂ mass and activity and total or LDL-cholesterol (all $p < 0.05$). However, after adjustment by sex, age and statins intake, only the relation between Lp-PLA₂ activity and total or LDL-cholesterol remained significant ($r = 0.43$, $p = 0.007$ for LDL-cholesterol; $r = 0.39$, $p = 0.03$ for total cholesterol).

3.3. Lp-PLA₂ mass and activity and preventive treatments during follow-up

At the inclusion visit, 17 (23%) of our patients were under anticoagulants treatment, 26 (35%) took aspirin, 43 (57%) clopidogrel and 53 (71%) statins (Table 1). Some of these preventive treatments were associated with lower Lp-PLA₂ mass and activity levels in the univariate analyses, such as statins [Lp-PLA₂ mass 255 ng/ml in patients on statins vs 327 in patients not on statins ($p = 0.034$); Lp-PLA₂ activity 147 nmol/ml/min in patients on statins vs 160 nmol/ml/min in patients not on statins ($p = 0.049$)] or clopidogrel [Lp-PLA₂ mass 251 ng/ml in patients on clopidogrel vs 336 ng/ml in patients not on clopidogrel ($p = 0.001$)].

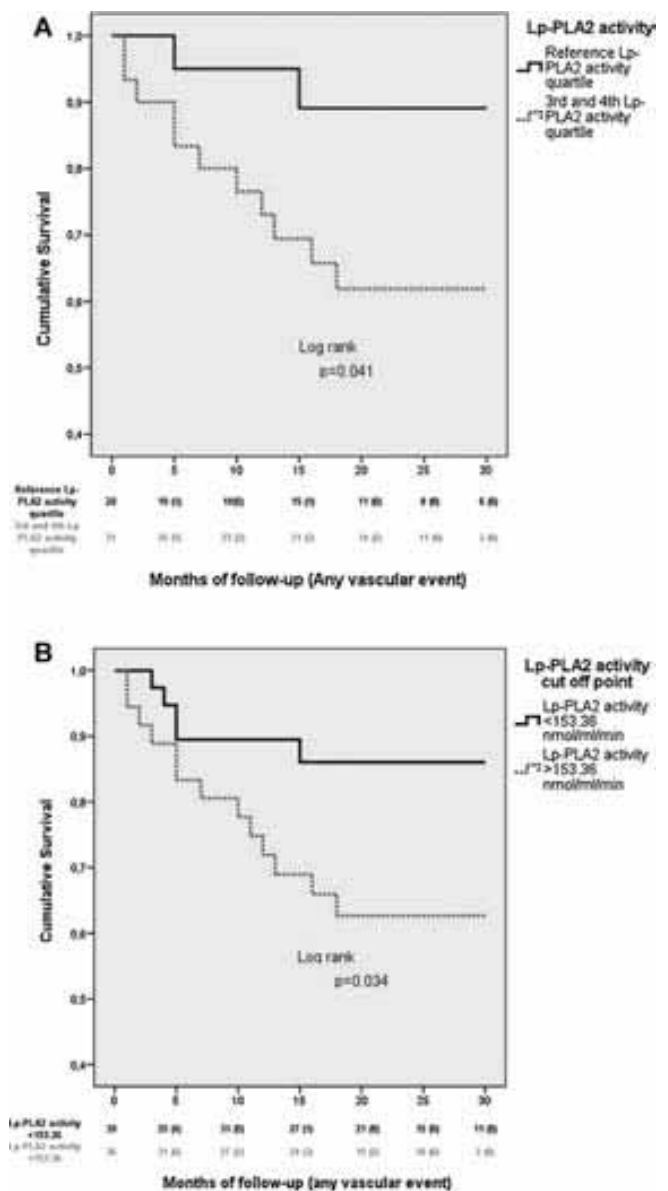


Fig. 2. Panel (A) Kaplan–Meier curves showing the cumulative survival of any vascular event during follow-up between reference quartile (black line) and top 3rd and 4th quartile (grey line). Panel (B) Kaplan–Meier curves showing the cumulative survival of any vascular event during follow-up between groups above (black line) and below (grey line) Lp-PLA₂ activity cut-off point levels.

3.4. Predictors of new major vascular events

During a median follow-up time of 23 months (interquartile range 17–29), 18 patients (24%) suffered a major ischemic event, categorized as follows: 10 ischemic strokes, 3 TIAs and 5 myocardial infarctions (MI). Of these major ischemic events, 9 (50%) occurred within the first 5 months after inclusion and only 4 took place after the first year of follow-up.

Regarding recurrent strokes and TIA, all of them were attributable to intracranial atherostenoses, located in the intracranial internal carotid artery in 5 patients, in the middle cerebral artery in 5 patients, in the basilar artery in 2 and in the posterior cerebral artery in 1.

Survival analyses were performed to identify which, among all baseline factors were associated with the pre-specified combined end-point (stroke/TIA, MI/angina or vascular death). Hypertensive patients and those with more than two vascular risk factors

Table 2
Demographic characteristics and vascular risk factors according to Lp-PLA₂ levels in patients with symptomatic intracranial stenosis.

Variable	Lp-PLA ₂ mass (ng/ml) Median (IQ range)	p-Value	Lp-PLA ₂ activity (nmol/ml/min) Median (IQ range)	p-Value
Gender				
• Men	285 (233–362)	0.951	158 (134–178)	0.02
• Women	297 (219–414)		128 (99–165)	
Age				
• ≤66 years	292 (225–400)	0.953	149 (109–179)	0.167
• >66 years	284 (237–396)		153 (134–177)	
Current smoking				
• No	285 (224–405)	0.562	148 (119–181)	0.246
• Yes	288 (232–393)		157 (134–177)	
Hypertension				
• No	288 (216–425)	0.732	161 (127–183)	0.546
• Yes	286 (235–381)		149 (128–173)	
Diabetes mellitus				
• No	275 (223–384)	0.398	149 (124–177)	0.324
• Yes	303 (240–406)		159 (131–180)	
Hyperlipidemia				
• No	322 (235–412)	0.569	156 (128–187)	0.482
• Yes	286 (232–381)		152 (127–177)	
Basal LDL >130 mg/dl				
• No	281 (220–381)	0.089	141 (119–166)	0.001
• Yes	341 (279–407)		177 (157–189)	
Coronary artery disease				
• No	291 (232–400)	0.498	153 (129–177)	0.743
• Yes	281 (202–382)		163 (131–185)	
Number of cardiovascular risk factors				
• 0–2	302 (230–385)	0.317	158 (131–178)	0.501
• >2	303 (247–400)		158 (133–176)	
Intracranial stenosis by TCD				
• Single	232 (211–425)	0.176	127 (111–156)	0.047
• Multiple	296 (246–393)		149 (127–178)	
TCD progression				
• No	285 (232–399)	0.841	149 (126–177)	0.598
• Yes	302 (230–385)		158 (131–178)	
Secondary prevention until baseline visit				
Statins No Yes				
• No	327 (271–396)	0.034	160 (134–179)	0.049
• Yes	255 (216–392)		146 (119–173)	
Aspirin				
• No	280 (232–408)	0.648	151 (126–177)	0.758
• Yes	297 (232–360)		155 (128–178)	
Clopidogrel				
• No	336 (279–422)	0.001	162 (123–180)	0.240
• Yes	251 (217–352)		149 (127–168)	
Baseline episode				
• TIA	304 (225–396)	0.647	152 (120–178)	0.926
• Established infarct	286 (232–399)		152 (129–177)	

Results are expressed as medians (interquartile (IQ) range). LDL = low density lipoprotein; TCD = transcranial doppler; TIA = transient ischemic attack.

showed a trend towards higher recurrence rates ($p=0.088$ and $p=0.1$, respectively). Also, the presence of past medical history of coronary artery disease (28% vs 14%, $p=0.046$) and the increasing number of stenosis detected by TCD ($p=0.007$) were associated with the presence of the combined end-point. No other baseline factors or preventive treatments were associated with the rate of recurrence.

Regarding Lp-PLA₂ mass, no significant differences in rates of the combined end-point (stroke/TIA, MI/angina or vascular death) were observed across Lp-PLA₂ mass quartiles (combined end-point rates in the first quartile 0%, second quartile 33%, third quartile 28% and fourth quartile 21%, $p=0.38$).

However, Lp-PLA₂ activity was associated with the presence of new vascular events (combined end-point), which were increased across Lp-PLA₂ activity quartiles [(10% (bottom quartile) vs 21% (second quartile) vs 38% (third quartile) vs 33% (top quartile), $p=0.04$]. Fig. 2A shows cumulative survival of any vascular event through follow-up between reference quartile and top third and fourth quartiles.

Furthermore, a ROC curve identified 153.36 nmol/ml/min as an optimal cut-off point (sensitivity 0.72 and specificity 0.59, area under the curve = 0.632) to discriminate between the patients who

experienced a recurrent vascular event and the patients who did not. Likewise, Kaplan–Meier curve (Fig. 2B) shows a significantly higher rate of vascular recurrence in the group of patients with Lp-PLA₂ activity over 153 nmol/ml/min than in those with levels below that cut-off ($p=0.034$).

According to the rates of recurrent events individually (stroke/TIA or angina/MI or vascular death alone), no significant association was found with either Lp-PLA₂ mass or activity (data not shown).

Furthermore, in order to find potential predictors for the appearance of the pre-specified end-point, a multivariate proportional hazards regression analysis (Cox Regression) was performed including all associated factors and adjusting for age, gender and vascular risk factors. Among all them, Lp-PLA₂ activity higher than 153 nmol/ml/min was the strongest predictor of vascular recurrence (hazard ratio 2.89; 95% CI 1.029 to 8.096; $p=0.044$).

Finally, some studies have previously shown how Lp-PLA₂ predictive value might be influenced by LDL levels [15–17] and hormones [18]. Although it would be interesting, our small sample size does not allow to perform stratification analyses exploring these hypotheses.

4. Discussion

The main finding of the present prospective study is that elevated Lp-PLA₂ activity identifies patients with first-ever stroke or TIA associated with intracranial atherosclerotic disease at higher risk of suffering recurrent vascular events. In our study, patients with Lp-PLA₂ activity over 153 nmol/ml/min had almost three times more risk than patients with activity below that cut-off level, and this risk was independent of other well-known traditional vascular risk factors.

This result is in agreement with most of the previous literature identifying Lp-PLA₂ activity [19,20] as an independent risk biomarker of vascular events and extends previous knowledge in a particularly high-risk group of patients, such as those with intracranial atherosclerotic disease.

Previous stroke studies in healthy population [16,19] or unselected patients during the acute (<72 h), subacute (<6 days) [15] or chronic (6 month) phase [20] after initial stroke, demonstrated that Lp-PLA₂ is a predictor of stroke, coronary heart disease and vascular death [21]. However, to our knowledge, the impact of Lp-PLA₂ levels on the natural history of ICAD had not been addressed so far.

It is well documented that some drugs are Lp-PLA₂ inhibitors: statins, fibrates and nicotinic acid can reduce between 20% and 30% Lp-PLA₂ mass and activity in blood; azetidinones (darapladib, varespladib), combined with statins, achieve reductions in Lp-PLA₂ mass and activity of 66% in blood and 80% in the atherosclerotic plaque; and also angiotensin II type 1 receptor blocker (irbesartan) has shown inhibitory Lp-PLA₂ properties [9,22]. In our study, not only statins but also clopidogrel were associated with lower Lp-PLA₂ levels in univariate analyses. However, the relationship between clopidogrel and Lp-PLA₂ deserves further studies, since it has not been reported previously and might be influenced by potential confounders (other treatments, etc.).

In spite of the predictive value of Lp-PLA₂ activity, Lp-PLA₂ mass levels did not show any association with vascular recurrence in our study population. Therefore, our results could also suggest that activity is a better outcome predictor than mass in certain studies and populations [23,24], and these tests can be complementary in some clinical conditions. However, we have found a weaker significant correlation between Lp-PLA₂ mass and activity ($r=0.19$, $p=0.004$) than other previous reports, which have shown correlation between mass and activity ranging from 0.36 to 0.86 [25,26]. This may be the result of a limited sample population of $n=75$ for the present study.

Unstable atherosclerotic plaques with a rich inflammatory component have been found infrequently in intracranial large vessels, and it has been suggested that the atherosclerotic process in intracranial arteries may have differential characteristics [27].

Furthermore, intracranial stenoses are known to be dynamic lesions whose progression (i.e. worsening degree of stenoses) may determine an increased risk of recurrent ischemic events [4].

In our population Lp-PLA₂ activity was associated with the degree of atherosclerotic intracranial disease at baseline, as the enzyme activity was increased in patients with multiple or bilateral stenoses. However, single measurements at baseline of Lp-PLA₂ mass or activity were not related to disease progression over time as determined by serial TCD examinations, suggesting that mechanisms other than worsening of the stenosis degree might be involved in the risk of recurrent events/are the cause of the recurrent events.

In certain previous reports, Lp-PLA₂ has not been correlated with intima-media thickness (IMT) or atherosclerotic plaque presence [28], but Lp-PLA₂ and its downstream inflammatory mediators LysoPC and oxidized fatty acids (oxFA) have been found in higher amount in symptomatic plaques in association with other instability markers such as macrophages, NAD(P)H oxidase and

matrix-metalloproteinase 2 [29]. Therefore, Lp-PLA₂ activity might be associated with vascular recurrence by promoting plaque instability. Similar data had been reported for other inflammatory markers like CRP that determines the risk of ischemic stroke independently of severity of carotid IMT [30].

This study has some limitations. First, the sample size is small and our power is of 75% for the prediction of any ischemic event. Increasing sample size in properly designed multicentre studies would be desirable to improve the power of the study for the prediction of any ischemic event and even more, for the prediction of strokes related to ICAD. Second, since the Lp-PLA₂ mass and activity were measured only once at baseline, intra-individual variation during follow-up could not be assessed. However, very little intra-individual variability in plasma Lp-PLA₂ levels over time [7], as well as between subacute-chronic stages after a vascular event has been described previously [20]. Third, although an extensive work up was done to exclude nonatherosclerotic intracranial stenoses, neither TCD nor MRA nor CTA provides information regarding the histopathological nature of the lesions responsible for vessel narrowing, and we may have included patients with stenoses caused by different underlying vascular pathologies. Finally, we relied on TCD and MRA or CTA for the diagnosis of intracranial stenoses, and not on conventional angiography, considered the gold standard, in order to avoid invasive procedures to our patients.

In conclusion, increased Lp-PLA₂ activity levels strongly predict the risk for new intracranial large-artery occlusive disease-related and other ischemic events in first-ever TIA or stroke patients with intracranial stenoses. Elevated Lp-PLA₂ activity levels in plasma may identify high-risk intracranial large-artery occlusive disease patients, in whom strict vigilance regarding vascular risk factors and therapy combining antithrombotic and anti-inflammatory strategies may be indicated and might be potentially useful in the daily clinics evaluation of vascular recurrence risk, especially in patients without other available instrumental data.

Acknowledgments

We are grateful to the entire Stroke Department from Hospital Vall d'Hebron. P.D. (CP09/00136) and A.R. (CP09/00265) are supported by the Miguel Servet programme from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III). A.M. a post-residence research training contract from Vall d'Hebron Institut de Research. This work has been supported by a research grant from the Spanish Stroke Research Network RENEVAS (RD06/0026/0010). Lp-PLA₂ assays were kindly donated by Diadexus.

References

- [1] Sacco R, Kargman DE, Quiong Gu, Zamanillo MC. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 1995;26:14–20.
- [2] Wong KS, Huang YN, Gao S, et al. Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology* 1998;50:812–3.
- [3] Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, et al. Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Trial Investigators: Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* 2005;352:1305–16.
- [4] Arenillas JF, Molina CA, Montaner J, et al. Progression and clinical recurrence of symptomatic middle cerebral artery stenosis: a long-term follow-up transcranial Doppler ultrasound study. *Stroke* 2001;32:2898–904.
- [5] Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina C, et al. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever TIA and stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* 2003;34:2463–70.
- [6] Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina CA, et al. Progresión of symptomatic intracranial large-artery atherosclerosis is associated with a proinflammatory state and impaired fibrinolysis. *Stroke* 2008;39:1456–63.
- [7] Elkind MS, Leon V, Moon YP, Paik MC, Sacco RL. High-sensitivity C-reactive protein and lipoprotein-associated phospholipase A₂ stability before and after stroke and myocardial infarction. *Stroke* 2009;40:3233–7.
- [8] Cederholm A, Svenungsson E, Stengel D, et al. Platelet-activating factor-acetylhydrolase and other novel risk and protective factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:2869–76.

- [9] Rosenson RS. Future role for selective phospholipase A₂ inhibitors in the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:93–101.
- [10] Persson M, Berglund G, Nelson JJ, Hedblad B. Lp-PLA₂ activity and mass are associated with increased incidence of ischemic stroke: a population-based cohort study from Malmö, Sweden. *Atherosclerosis* 2008;200:191–8.
- [11] Robins SJ, Collins D, Nelson JJ, Bloomfield HE, Asztalos BF. Cardiovascular events with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) and low high-density lipoprotein-cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1172–8.
- [12] Nambi V, Hoogeveen RC, Chambless L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and high-sensitivity C-reactive protein improve the stratification of ischemic stroke risk in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke* 2009;40:376–81.
- [13] Arenillas JF, Molina CA, Chacón P, et al. High lipoproteína (a), diabetes and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology* 2004;63:27–32.
- [14] Arenillas JF, Massot A, Alvarez-Sabin J, et al. C-reactive protein gene C1444T polymorphism and risk of recurrent ischemic events in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic stenoses. *Cerebrovasc Dis* 2009;28:95–102.
- [15] Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A₂, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med* 2006;166:2073–80.
- [16] Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 2004;109:837–42.
- [17] Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity and risk of recurrent stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009;27:42–50.
- [18] Wassertheil-Smoller S, Kooperberg C, McGinn AP, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, hormone use, and the risk of ischemic stroke in postmenopausal women. *Hypertension* 2008;51:1115–22.
- [19] Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2005;111:570–5.
- [20] Furie KL, Parides MK, Greer DM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity predicts early stroke recurrence [abstract]. *Stroke* 2007;38:458.
- [21] Lp-PLA(2) Studies CollaborationThompson A, Gao P, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010;375:1536–44.
- [22] Virani SS, Nambi V. The role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ as a marker for atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2007;9:97–103.
- [23] Persson M, Hedblad B, Nelson JJ, Berglund G. Elevated Lp-PLA₂ levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1411–6.
- [24] Cucchiara BL, Messe SR, Sansing L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and C-reactive protein for risk-stratification of patients with TIA. *Stroke* 2009;40:2332–6.
- [25] O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial. *Circulation* 2006;113:1745–52.
- [26] Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), plateletactivating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000;150:413–9.
- [27] Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, et al. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999;100:717–22.
- [28] Kardys I, Oei HH, van der Meer IM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and measures of extracoronary atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:631–6.
- [29] Mannheim D, Herrmann J, Versari D, et al. Enhanced expression of Lp-PLA₂ and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 2008;39:1448–55.
- [30] Cao JJ, Thach C, Manolio TA, et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly. The cardiovascular health study. *Circulation* 2003;108:166–70.

Decreased Levels of Angiogenic Growth Factors in Intracranial Atherosclerotic Disease despite Severity-Related Increase in Endothelial Progenitor Cell Counts

A. Massot^b M. Navarro-Sobrino^b A. Penalba^b J.F. Arenillas^c D. Giralt^b
M. Ribó^a C.A. Molina^a J. Alvarez-Sabín^a J. Montaner^{a, b} A. Rosell^b

^aNeurovascular Unit and ^bNeurovascular Research Laboratory, Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, and ^cNeurovascular/Stroke Unit, Department of Neurology, Hospital Clínico, Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain

Key Words

Atherosclerosis · Endothelial progenitor cells · Growth factors · Intracranial stenosis · Stenosis severity

Abstract

Background: Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) is an important cause of ischemic stroke (IS) and endothelial dysfunction plays a critical role in its onset and progression. Endothelial progenitor cells (EPCs) and endothelial production of angiogenic growth factors (AGFs) may play an essential role in this process. This study investigated the association of EPCs and AGFs with ICAD severity. **Methods:** A total of 42 patients who had experienced a transient ischemic attack (TIA) or IS attributable to symptomatic ICAD were included. Clinical and neurosonological evaluations were conducted between 2.4 and 8.7 years after the initial cerebrovascular event. Severe ICAD was defined as the presence of at least 1 severe intracranial stenosis, and extensive ICAD as 3 or more intracranial stenoses. Blood samples were obtained to determine EPC levels using flow cytometry (CD34+KDR+ cells), and the plasma levels of several growth factors were as-

sessed with a protein array (Searchlight[®]). Twenty-two individuals without cerebrovascular disease and with normal ultrasonographic examination were also included. **Results:** No difference in the count of circulating EPCs was found between patients and controls, and a moderate increase in the number of EPCs/ml was noted in patients with extensive ICAD ($p = 0.05$). Patients presented decreased levels of fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF-BB) compared with controls ($p = 0.002$, $p = 0.079$ and $p = 0.061$, respectively). Higher levels of FGF, VEGF and PDGF-BB were found in patients with severe ICAD ($p = 0.007$, $p = 0.07$ and $p = 0.07$, respectively), but there was no correlation between any AGFs and EPCs. **Conclusions:** Symptomatic ICAD patients have decreased levels of AGFs with no correlation to the number of circulating EPCs, while patients with severe ICAD have higher levels of EPCs, FGF, VEGF and PDGF-BBs. This suggests that reduced EPC and proangiogenic factor production capacity is implicated in ICAD pathogenesis, while the more severe forms of chronic brain hypoperfusion in ICAD patients might stimulate EPC mobilization and AGF production.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) is a common cause of ischemic stroke (IS) worldwide [1–3] and is associated with a high rate of recurrence, even in patients receiving the best current antithrombotic [4] and endovascular treatments [5]. There is therefore a need to find new therapies for this disease. Endothelial injury and dysfunction resulting from cardiovascular risk factors (CVRFs) may play a critical role in the onset and progression of ICAD [5, 6].

Endothelial progenitor cells (EPCs) are bone-marrow-derived stem cells with the ability to differentiate into mature endothelial cells and to participate in endothelium regeneration [7, 8]. Both EPCs and endothelial production of angiogenic growth factors (AGFs), such as vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF-BB), fibroblast growth factor (FGF) and hepatocyte growth factor (HGF), may play an essential role in this process [9–11].

EPCs have been associated with postischemic endothelial repair in cardiac and peripheral vessels [8, 12], as well as in the cerebral vasculature [13–15]. Moreover, a reduced number of circulating EPCs has been shown to contribute to carotid atherosclerosis [16]. Thus, EPCs play a role in vascular dysfunction. However, their role in ICAD remains unexplored.

The aim of the present study was to examine if the circulating levels of EPCs and AGFs were altered in patients with ICAD and related to ICAD severity. Therefore, the number of EPCs and levels of AGFs were determined in the blood of patients with symptomatic ICAD of different severity, as well as in control subjects.

Patients and Methods

The cohort was composed of 42 patients (selected in chronological order from a cohort of 100 patients included in a previous study [17]) who had experienced transient ischemic attack (TIA) or IS due to intracranial stenosis. Our diagnostic protocol during admission and the inclusion criteria have been reported in detail elsewhere [17]. In summary, intracranial stenoses were confirmed with MR or CT angiography at the time of the initial ischemic event. As reported extensively elsewhere [17], in order to rule out stroke causes other than ICAD in the initial cohort, we excluded patients without angiographic confirmation, or with emboligenic cardiopathy, complete regression of symptomatic intracranial stenosis, TIA or stroke related to cervical internal carotid artery (ICA) stenoses, neoplasm, inflammatory conditions, nonatherosclerotic causes of intracranial stenosis, stroke-related death or severe disability, and patients who refused to give their informed consent.

A total of 100 patients were initially included, but 58 patients were excluded during the follow-up for the following reasons: onset of emboligenic cardiopathy ($n = 3$), neoplasm ($n = 6$), severe renal failure ($n = 5$), stroke-related death or disability ($n = 13$), death of nonvascular cause ($n = 6$), death of unknown cause ($n = 7$), impossible to locate ($n = 12$) or refusal to provide informed consent ($n = 6$). Finally, 42 patients were included between August 2009 and October 2010.

Patients were included in this study between 2.4 and 8.7 (mean 6.7 ± 1.2) years after the event. Twenty-two control subjects with normal transcranial and carotid ultrasonographic results and without cardiovascular pathology were also included.

Clinical Variables

A detailed medical history of CVRFs and secondary prevention therapies was recorded as previously described [17, 18]. Transcranial and carotid ultrasonographic examinations were performed on each patient by an experienced stroke neurologist who was blinded to clinical data at the time of EPC and AGF determination.

Blood (20 ml) was collected into EDTA tubes from patients and controls. Acute infection, hormone therapy, blood transfusion or treatment with erythropoietin, surgery or trauma in the previous 3 months, and inflammatory conditions were ruled out by careful medical history taking prior to sampling. All patients and controls gave written informed consent to participate in the study, which was approved by the local ethics committee and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Ultrasound Protocol

Transcranial Doppler (TCD) and supra-aortic trunk examinations were carried out using a Multi-Dop X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH, Germany) device, with a hand-held transducer in range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz.

For TCD examination, a standard method of insonation was used through the temporal, occipital and orbital windows without compression testing, as previously described [19]. Intracranial stenoses were diagnosed according to the TCD-based definition used in all our previous studies, in accordance with validated criteria [18].

Extensive ICAD was defined as 3 or more intracranial stenoses, severe ICAD was defined as at least 1 severe intracranial stenosis, and combined ICAD was defined as any hemodynamically relevant ($>50\%$) ICA stenosis.

ICA stenoses were categorized as absent; mild, when one or both ICAs had a mild ($<50\%$) stenosis; moderate, when any of the ICAs presented a moderate ($<70\%$) stenosis, and severe, when any ICA showed a severe ($70\text{--}99\%$) asymptomatic stenosis [19].

Quantification of Circulating EPCs by Flow Cytometry

A Ficoll gradient was used to isolate human peripheral blood mononuclear cells [9, 20]. In brief, blood was diluted (1:1) with PBS with 2% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA), and 8 ml of diluted blood was then overlaid onto 5.5 ml Ficoll-Paque Plus™ in tubes (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Cells were centrifuged for 30 min at room temperature (1,400 rpm). The peripheral blood mononuclear cell layer thus yielded was then isolated and centrifuged for 10 min (1,500 rpm). Cell pellets were washed with red cell lysis buffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 and 0.115 mM EDTA) and centrifuged for 5 min (1,500 rpm). Finally, peripheral blood mono-

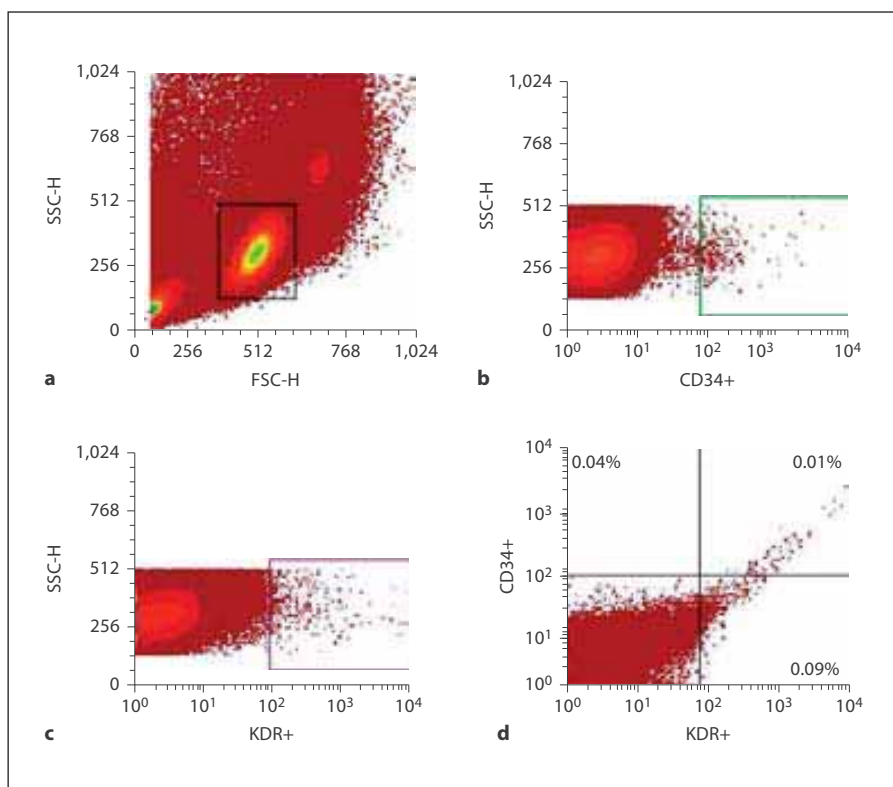


Fig. 1. FACS analysis of cells from an ICAD patient. **a** Density plot showing cell population density and distribution according to cell size (forward scatter, FSC) and cell granularity (sideward scatter, SSC). The blue gate indicates the populations selected for ongoing analysis. **b** CD34+ cells (green gate). **c** KDR+ cells (pink gate). **d** Final density plot showing selected KDR+CD34+ cells for quantification (upper right panel). Colors are depicted in the online version.

nuclear cells were washed with 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged for 5 min (1,500 rpm).

To assess cell surface antigen expression, 10⁶ viable cells counted with Trypan blue were stained with 20 μ l of each primary monoclonal antibody: 0.04 μ g/ml of KDR biotin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), 0.5 μ g/ml of CD34-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, San Jose, Calif., USA) and 44 μ g/ μ l of secondary ExtrAvidin-PE (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. EPCs were defined as CD34+KDR+ cells, and primitive bone-marrow-derived progenitor cells as CD34+ cells, as previously described [21, 22]. After incubation, cells were centrifuged for 5 min (1,500 rpm) and then mixed with 1 ml of PBA (1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide in PBS). Before analysis, the samples were filtered through 30- μ m CellTricks filters (Partec, Görlitz, Germany). Finally, a minimum of 3×10^5 events per sample was analyzed using the BD FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience). To control for nonspecific antibody binding, cells were also labeled with a fluorescent, negative isotype control antibody. The data were analyzed with FCS ExpressTM version 3, Research Edition (DeNovo Software, Los Angeles, Calif., USA; fig. 1). EPC and CD34+ counts were expressed as the number of cells per milliliter of blood analyzed.

Immunoassay Analysis

Blood samples obtained in EDTA tubes were centrifuged for 15 min (3,500 rpm) at 4°C and plasma samples were stored at -80°C until analysis. The Angiogenesis Array 2 (Aushon Biosystems, Billerica, Mass., USA) was used to determine the levels of four angiogenic factors: PDGF-BB, HGF, FGF and VEGF. Samples were assayed twice and the mean value of the two measure-

ments was used. The mean intra-assay coefficients of variation were <20%. The images were then analyzed with Array Analyst (Aushon Biosystems, Billerica, Mass., USA). The sensitivity limits were 1 pg/ml for PDGF-BB, 3.1 pg/ml for HGF, 2 pg/ml for FGF and 4.9 pg/ml for VEGF.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with SPSS[®] version 15.0. Normality for continuous variables was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. The EPCs/ml variable was normally distributed. For variables that were not normally distributed, values were expressed as medians (interquartile ranges), and statistical significance for intergroup differences was assessed with the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. For variables that were normally distributed, values were expressed as means \pm SD, and significance was assessed using ANOVA or Student's t test. The correlations between continuous variables were determined with Spearman or Pearson's coefficients. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Baseline Clinical Variables

The characteristics and CVRFs profiles of the study and control participants at the time of EPC determination are shown in table 1.

Table 1. Characteristics of the study population at the time of EPC and AGF determination

	Cases (n = 42)	Controls (n = 22)	p value
Age, years	71.5±8.1	63.5±11.4	0.691
Males	32 (76.2%)	4 (18.2%)	<0.001
Current smokers	4 (11.4%)	1 (5%)	0.643
Hypertension	36 (85.7%)	7 (41.2%)	0.001
Diabetes mellitus	20 (47.6%)	1 (5.9%)	0.002
Hypercholesterolemia	31 (73.8%)	6 (31.6%)	0.002
Coronary heart disease	7 (16.7%)	0 (0%)	0.211
Peripheral artery disease	5 (11.9%)	1 (4.5%)	0.999
Vascular risk factors (>2)	27 (64.3%)	1 (4.5%)	<0.001
Anticoagulants	4 (9.5%)	1 (4.5%)	0.652
Antiplatelets	38 (90.5%)	2 (9.1%)	<0.001
Statins	36 (85.7%)	2 (9.1%)	<0.001
ACEIs	18 (42.9%)	4 (18.2%)	0.048
Qualifying event			
Stroke	30 (76.2%)	–	–
TIA	12 (28.6%)	–	–
Location of symptomatic intracranial stenosis			
Intracranial ICA	8 (19.1%)	–	–
MCA	17 (40.4%)	–	–
PCA	6 (14.3%)	–	–
VB	7 (16.7%)	–	–
Undetermined	4 (9.5%)	–	–
Extensive ICAD stenoses (>2)	21 (51.2%)	–	–
Severe intracranial stenosis	14 (33.3%)	–	–
ICA stenosis			
Mild	22 (52.4%)	–	–
Moderate	5 (11.9%)	–	–
NIHSS	1 (0–1)	–	–

Results are expressed as means ± SD (age), numbers (%) of patients and medians (interquartile ranges; NIHSS). ACEIs = Angiotensin-converting enzyme inhibitors; MCA = middle cerebral artery; PCA = posterior cerebral artery; VB = intracranial vertebral and basilar arteries.

The study population consisted of 32 men (76.2%) and 10 women (23.8%) with a mean age of 71.5 ± 8.1 years. The qualifying event attributable to the symptomatic ICAD was IS in 30 patients (71.4%) and TIA in the other 12 patients (28.6%). The localization of ICAD was recorded as the middle cerebral artery, which is the most affected arterial segment (40.4%; table 1). Twenty-one patients presented with extensive ICAD, 14 with at least 1 severe ICAD, and 8 patients with combined ICAD with ICA-relevant stenosis. The median National Institutes of Health Stroke Scale score at the time of EPC determination was 1 (0–1). With regard to secondary prevention therapies, at the time of EPC determination, 38 patients (90.5%) were treated with antiplatelet agents, 4 (9.5%)

Table 2. EPC counts (CD34+KDR+ cells/ml) according to demographic characteristics and vascular risk factors

Variable	n	No	Yes	p value
Cases	42	309±371	251±273	0.480
Males	32	260±257	248±282	0.904
Age >66 years	30	322±314	223±256	0.296
Current smokers	4	303±297	111±101	0.212
Hypertension	36	348±482	235±229	0.595
Diabetes mellitus	20	305±285	192±254	0.184
Hyperlipidemia	31	265±271	246±278	0.842
Coronary artery disease	7	266±297	208±129	0.621
Intermittent claudication	5	240±264	334±358	0.474
CVRFs >2	27	368±337	186±211	0.037
Aspirin	15	258±286	239±259	0.834
Clopidogrel	34	466±394	200±214	0.102
Statins	36	312±309	241±270	0.564
ACEIs	18	204±206	314±340	0.199
ARBs	12	268±287	208±242	0.527
≥1 severe ICS	14	256±272	241±285	0.871
ICAD associated with >50% ICA stenoses	5	207±199	577±509	0.180
ICS >2	21	170±154	337±338	0.050

Results are expressed as means ± SD. ACEIs = Angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs = angiotensin receptor blockers; ICS = intracranial stenoses.

with oral anticoagulation therapy and 1 (0.42%) with both. In addition, 36 patients (85.7%) were taking statins, 18 (42.9%) were taking angiotensin-converting enzyme inhibitors and 12 (28.6%) were taking angiotensin receptor blockers.

The stenosis-free controls consisted of 22 patients' relatives with a mean age of 63.5 ± 11.4 years and normal ultrasound results. This group was composed mainly of women (81.8%), and the prevalence rates of hypertension, hypercholesterolemia and CVRFs were lower than that of the patients (table 1).

EPCs, CVRFs and Preventive Treatments

As shown in table 2, no significant difference was found in EPCs/ml between patients and controls (251 ± 273 vs. 309 ± 371; p = 0.48). Interestingly, patients with a higher number of CVRFs (0–2 vs. >2) had lower levels of circulating EPCs/ml (368 ± 337 vs. 186 ± 211 EPCs/ml; p = 0.037; table 2). In addition, no significant difference was found regarding CD34+ cells/ml, and patients with a higher number of CVRFs (0–2 vs. >2) also presented a higher level of circulating CD34+ cells/ml: 1,474 (575–2,880) versus 451 (280–1,187), p = 0.024. Patients' drug

Table 3. AGF levels (in pg/ml) for severe, extensive and combined ICAD

Variable	No	Yes	p value
Severe ICAD, n	28	14	
PDGF-BB	99.65 (53.1–198.3)	157.4 (92.6–336.3)	0.07
FGF	8.3±8	16.1±7.9	0.007
HGF	519±185.7	553.7±162.3	0.555
VEGF	63.4±47.3	96.2±55.8	0.07
Extensive ICAD, n	21	21	
PDGF-BB	135.7 (54.4–202.2)	100.1 (59.5–261.2)	0.969
FGF	10.7±9.8	10.6±7.7	0.973
HGF	535.3±182.1	525.8±176.1	0.865
VEGF	85.9±57.2	61.5±43.5	0.155
Combined ICAD, n	37	5	
PDGF-BB	108 (54.7–206.5)	157.9 (79–275.4)	0.361
FGF	10.7±9.2	11.4±4.9	0.867
HGF	533.9±182.5	451.4±184.4	0.311
VEGF	70.9±52.3	110.3±32.6	0.211

Results are expressed as means ± SD or medians (interquartile ranges), as appropriate.

regimens did not influence the levels of circulating EPCs (table 2).

EPCs and ICAD Severity

Interestingly, patients who presented with extensive ICAD (n = 21) had higher levels of circulating EPCs/ml than those with 2 or fewer intracranial stenoses (0–2 stenosis: 170.25 ± 154.46 vs. >2 stenosis: 337.33 ± 338 ; $p = 0.05$). No difference was observed in EPC or CD34+ levels in patients with or without severe intracranial stenosis (n = 14) or combined ICAD (n = 5).

Angiogenic Factors

FGF, VEGF and PDGF-BB levels were lower in patients than in controls: FGF: 10.7 ± 8.69 versus 19.9 ± 12.81 pg/ml, $p = 0.002$; VEGF: 74.05 ± 51.8 versus 105.53 ± 64.8 pg/ml, $p = 0.053$, and PDGF-BB: 118.9 (60.3–209) versus 203.8 (106.5–351.4) pg/ml, $p = 0.055$. A positive correlation was found between FGF and EPCs/ml ($r = 0.556$; $p = 0.011$) in controls, but no correlation was found between EPCs/ml or CD34+ cells/ml and AGFs in patients or controls.

Finally, severe ICAD stenosis was associated with higher levels of FGF (8.3 ± 8 vs. 16.1 ± 7.9 pg/ml; $p = 0.007$) and higher levels of PDGF-BB (although the latter finding was not statistically significant): 99.65 (53.1–198.3) versus 157.4 (92.6–336.3) pg/ml ($p = 0.07$) and VEGF: 63.4 ± 47.3 versus 96.2 ± 55.8 pg/ml ($p = 0.07$). No association was found between AGF levels and extensive or combined ICAD (table 3).

Discussion

The main finding of the present study is that patients with symptomatic ICAD have modestly increased levels of circulating EPC, VEGF and FGF depending on ICAD severity, and have a lower concentration of FGF, VEGF and PDGF-BB than controls. However, we could not find any correlation between the studied AGFs and circulating EPC levels (defined as CD34+KDR+ cells).

Previous studies have identified EPCs as markers of vascular function [13–15, 23, 24] and reported a correlation between low EPC counts in blood and increased carotid intima-media thickness and the presence of carotid plaques [16]. Moreover, the levels of CD34+, a more immature, and generic progenitor cell population, have been shown to correlate better with cardiovascular parameters and risk estimates for cardiovascular events than CD34+/KDR+ and CD133+ EPC phenotypes [25]. Other authors have reported that CD34+/CD133+ EPC phenotypes in the acute phase of ischemic stroke correlate with outcome [26]. In addition, it is known that the number of EPC populations increases in the context of early cerebral ischemia after acute stroke, returning to baseline levels after 1 month [9, 14, 15, 27].

In the present study, we found no difference between ICAD patients and healthy controls regarding circulating EPCs or CD34+ cells. In addition to the presence of ICAD, several other significant factors could have led to this result, such as age, sex and drug treatments, as described elsewhere [28, 29]. However, in this study, no dif-

ference in EPC circulating levels was found between patients with or without treatment with statins, antiplatelets or other drugs. Regarding sex, the number of women in the control cohort was significantly higher than in the ICAD group. Although estrogens have been described as modulators of EPC levels and function [28, 29], this boosting effect was probably minimized in female subjects, because only women without hormonal treatment at postmenopausal age were included. Overall, our results showed no increase in the amount of circulating EPCs during the chronic stroke phase, in agreement with previous studies [9, 14, 15].

Interestingly, we found a moderate increase in the EPC count, but no increase in CD34+ cells (a less specialized population of bone-marrow-derived cells) in patients with a higher number of intracranial stenoses. Although cerebral perfusion was not assessed in our patients, these results may reveal a balance between chronic ischemic status, which induces EPC mobilization, and atherosclerotic disease, which is associated with a lower EPC count. Previous studies have shown that a higher number of EPCs could be detected in patients with nonatherosclerotic causes of intracranial stenoses, such as those with Moyamoya disease, than in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease or healthy individuals [30, 31]. However, our results suggest that EPC mobilization may be partially preserved in chronic ICAD in association with a higher number of intracranial stenoses.

It has been proposed that ischemia induces the release of VEGF and other AGFs from EPCs, which in turn stimulates EPC migration and angiogenesis via the VEGF-KDR signaling pathway [32–36]. Thus, chronic brain hypoperfusion due to intracranial stenosis could enhance the angiogenic response. In addition, atherosclerotic disease has been reported to cause dysfunction in this angiogenic response, which leads to decreased EPC migration [8, 23, 37, 38]. In our patients, we did observe that indicators of a more severe cerebral ischemic stimulus, such as the presence of severe intracranial stenosis, were associated with higher levels of FGF, VEGF and PDGF-BB (although this latter result was not significant). Conversely, we observed lower levels of VEGF, FGF and PDGF in ICAD patients than in healthy controls. This appears to indicate that the angiogenic response to ischemia is partially preserved in ICAD patients, but that a paracrine dysfunction may occur in the atherosclerotic tissue or in EPCs themselves, leading them to produce lower amounts of AGFs than in healthy subjects, which may ultimately cause reduced EPC migration and endothelial repair.

Our results also indicate a lack of correlation between circulating EPCs and AGFs in our patients, whereas a positive correlation was found between FGF and EPCs in healthy controls. Other authors have also found that the levels of some AGFs (such as VEGF and granulocyte macrophage colony-stimulating factor) did not correlate with the number of CD34+ cells in patients with atherothrombotic cerebral ischemic events [30]. In addition, a dysfunctional EPC migratory response to VEGF has been observed in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure [20]. This could be due to the intrinsic dysfunctional response of EPCs to AGFs in the context of atherosclerotic disease and/or AGF production from other sources in the vessel.

This study has some limitations. First, the sample size is small and this is reflected by low statistical power regarding the association between EPCs/ml and extensive ICAD (47%) and the levels of EPCs in ICAD patients and controls (10%). However, statistical power regarding the association of FGF and severe ICAD (71%) and the discrimination of FGF levels between cases and controls (84%) are acceptable. Moreover, only 42% of ICAD patients in the initial cohort ($n = 100$) were eligible for the present study, which could result in bias by underrepresentation of patients at higher risk of vascular and non-vascular causes. Increasing the sample size in properly designed multicenter studies would improve statistical power regarding the association between EPCs, AGFs and ICAD severity. Second, we have rather identified associations than established a causal relationship independent of other factors. Third, the numbers of circulating EPCs and AGFs represent a dynamic balance between their production and consumption, and because this number can fluctuate over time, performing flow cytometry at a single time point might be of limited value. In this sense, a shorter sampling period and repeated evaluations would be desirable. Lastly, EPCs constitute a heterogeneous cell population with various cell surface antigen expression profiles. Although there is no straightforward definition of a marker for this cell type, CD34+KDR+ cells have been commonly described as appropriate biomarkers for the identification of an EPC population [16, 21, 22], as have those including the CD133+ marker present in EPC populations [9, 27] and other stem cells. It must also be taken into account that we directly quantified EPCs, but did not evaluate their functional status, while other studies did do so [39, 40].

In conclusion, AGF levels are lower in symptomatic ICAD patients than in controls, but the number of circulating EPCs is similar. In this context, EPCs and/or ath-

erosclerotic vessels (as the principal sources of these AGFs) seem to retain dysfunctional characteristics in ICAD patients through a reduced capacity for proangiogenic factor production. Furthermore, patients presenting with severe forms of ICAD in terms of the number or severity of intracranial stenoses presented higher circulating levels of EPCs and AGFs but not of CD34+ cells, suggesting that at some levels of chronic hypoperfusion, more EPCs could be mobilized from the bone marrow and could stimulate AGF production sources. These findings support the hypothesis that AGFs play a role in the pathogenesis of ICAD and indicate that EPC or AGF replacement could constitute a therapeutic approach for ICAD in the future.

References

- Sacco R, Kargman DE, Quiong Gu, Zamantillo MC: Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. *The Northern Manhattan Stroke Study*. *Stroke* 1995;26:14–20.
- Wong KS, Huang YN, Gao S, Lam WWM, Chan YL, Kay R: Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology* 1998;50:812–813.
- Thomas GN, Chen XY, Lin JW, Tomlinson B, Lam WW, Liu R, et al: Middle cerebral artery stenosis increased the risk of vascular disease mortality among type 2 diabetic patients. *Cerebrovasc Dis* 2008;25:261–267.
- Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, et al: 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.
- Chimowitz MI, Lynn MJ, Derdeyn CP, Turan TN, Fiorella D, Lane BF, et al: Stenting versus aggressive medical therapy for intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* 2011;365:993–1003.
- Roquer J, Segura T, Serena J, Castillo J: Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO study. *Cerebrovasc Dis* 2009;27(suppl 1):25–37.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–967.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593–600.
- Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabín J, et al: Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvasc Res* 2010;80:317–323.
- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL: Peripheral blood ‘endothelial progenitor cells’ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164–1169.
- Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, Saadat-zadeh MR, Mead LE, Prater DN, et al: Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:1675–1682.
- Lasala GP, Silva JA, Kusnick BA, Minguell JJ: Combination stem cell therapy for the treatment of medically refractory coronary ischemia: a phase I study. *Cardiovasc Revasc Med* 2011;12:29–34.
- Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, et al: Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 2005;36:151–153.
- Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004;109:2972–2975.
- Yip HK, Chang LT, Chang WN, Lu CH, Liou CW, Lan MY, et al: Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:69–74.
- Lau KK, Chan YH, Yiu KH, Li SW, Tam S, Lau CP, et al: Burden of carotid atherosclerosis in patients with stroke: relationships with circulating endothelial progenitor cells and hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;21:445–451.
- Arenillas JF, Molina CA, Chacón P, Rovira A, Montaner J, Coscojuela P, et al: High lipoprotein (a), diabetes and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology* 2004;63:27–32.
- Arenillas JF, Álvarez-Sabín J, Molina CA, Chacón P, Montaner J, Rovira A, et al: 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.
- Arenillas JF, Massot A, Alvarez-Sabín J, Fernandez-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Chacon P, et al: C-reactive protein gene C1444T polymorphism and risk of recurrent ischemic events in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic stenoses. *Cerebrovasc Dis* 2009;28:95–102.
- Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al: Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1246–1252.
- George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A: Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng* 2006;12:331–335.
- Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A: Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008;197:496–503.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI10/00694) and the Spanish Stroke Research Network RENEVAS (RD06/0026/0010). A.M. was the recipient of a research contract from the Foundation Research Institute of the Vall d’Hebron University Hospital in collaboration with the ‘Caixa d’estalvis I Pensions de Barcelona’. A.R. is supported by the Miguel Servet program (CP09/00265) of the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III).

Disclosure Statement

The authors have nothing to disclose.

- 23 Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, et al: Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005;111:2981–2987.
- 24 Liman TG, Endres M: New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc Dis* 2012;33:492–499.
- 25 Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C, Boscaro E, Tiengo A, Dimmeler S, et al: Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis* 2009;207:213–219.
- 26 Cesari F, Nencini P, Nesi M, Caporale R, Giusti B, Abbate R, et al: Bone marrow-derived progenitor cells in the early phase of ischemic stroke: relation with stroke severity and discharge outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:1983–1990.
- 27 Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, Maric D, Luby M, Spatz M, et al: Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology* 2010;75:2059–2062.
- 28 Miller-Kasprzak E, Jagodziński PP: Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007;55:247–259.
- 29 Bulut D, Albrecht N, Imöhl M, Günesdogan B, Bulut-Streich N, Börgel J, et al: Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. *Clin Res Cardiol* 2007;96:258–263.
- 30 Rafat N, Beck GCh, Peña-Tapia PG, Schmiedek P, Vajkoczy P: Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with Moyamoya disease. *Stroke* 2009;40:432–438.
- 31 Ni G, Liu W, Huang X, Zhu S, Yue X, Chen Z, et al: Increased levels of circulating SDF-1 α and CD34(+) CXCR4(+) cells in patients with moyamoya disease. *Eur J Neurol* 2011;18:1304–1309.
- 32 Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, et al: Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 2003;83:65–73.
- 33 Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenzi V, Compernelle V, De Mol M, et al: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575–583.
- 34 Guo H, Huang L, Cheng M, Jin X, Zhao Y, Yi M: Serial measurement of serum basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 2006;393:56–59.
- 35 Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, et al: Cooperative effect of TNF α , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996;132:1177–1188.
- 36 Sobrino T, Pérez-Mato M, Brea D, Rodríguez-Yáñez M, Blanco M, Castillo J: Temporal profile of molecular signatures associated with circulating endothelial progenitor cells in human ischemic stroke. *J Neurosci Res* 2012;90:1788–1793.
- 37 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1–E7.
- 38 Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, Chang EI, Lin SE, Bastidas N, et al: Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1 α stabilization during ischemia. *Circulation* 2007;116:2818–2829.
- 39 Chu K, Jung KH, Lee ST, Park HK, Sinn DI, Kim JM, et al: Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke. *Stroke* 2008;39:1441–1447.
- 40 Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, Moltes O, et al: The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007;38:2759–2764.

5. SÍNTESI DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. Anàlisi de la població amb MAIC simptomàtica

Les característiques demogràfiques de la població estudiada indiquen que, en el nostre medi, els ictus deguts a MAIC tenen lloc predominantment en homes (67.6%) amb múltiples FRCV (més de 2 en el 48%) durant la sisena dècada de vida i en el territori anterior (ICA intracranial o ACM en un 60.7%).

La taxa anual de recurrència d'esdeveniments isquèmics (cerebrovasculars o coronaris) en el total de la població a estudi va ser del 12.6% en 1.8 anys de seguiment després de l'ictus (quart article). Cal remarcar però que, tenint en compte el temps entre l'episodi inicial i la visita d'inclusió, el 43.5% d'aquest episodis van tenir lloc durant l'any posterior a l'ictus de debut. D'aquests episodis entre el 69.5 i el 72.2% foren cerebrovasculars (infart o AIT), la qual cosa correspon a una taxa anual de recurrència d'ictus entre el 8.8 i el 9%. La mortalitat de causa vascular va ser del 2.9% (dos per ictus i un per IAM), que correspon a una taxa de mortalitat anual del 1.6%. Aquestes taxes de recurrència i mortalitat són similars a les observades en la majoria d'estudis previs, incloent l'estudi WASID prospectiu en el grup tractat amb antiagregants (tractament que va seguir el 77% dels nostres pacients) (70,76-79), però la taxa de recurrència d'ictus és inferior a la de l'estudi WASID prospectiu (14-15% en els pacients amb tractament amb aspirina i warfarina respectivament) (71). Aquestes xifres demostren que els pacients amb MAIC simptomàtica constitueixen un grup d'alt risc vascular.

Cal destacar també que dels 7 casos d'IAM registrats durant el seguiment, 5 van ser en pacients sense història prèvia de cardiopatia isquèmica. A més, es va trobar en el quart article que l'antecedent de malaltia coronària i claudicació intermitent s'associaven significativament a la recurrència d'ictus. Això reafirma que l'aterosclerosi és una malaltia sistèmica amb afectació conjunta de múltiples territoris vasculars, cosa que cal tenir en compte en el maneig i tractament d'aquests pacients.

Els pacients amb aterosclerosi intracranial tenen freqüentment una o varies estenosis intracranials asimptomàtiques a part de l'estenosi simptomàtica, quelcom que pot servir per distingir-los dels pacients amb estenosis d'origen embòlic. Així, en el 83% dels pacients inclosos en l'últim treball (cohort total) s'identificaren múltiples estenosis intracranials en el moment de l'ictus inicial, amb un nombre mitjà de 3 estenosis. Finalment, es va trobar una associació entre un major nombre d'estenosis intracranials

basals i el risc de recurrència d'esdeveniments isquèmic en el segon treball, quelcom que està en concordança amb altres estudis publicats (312).

5.2. Relació de les proteïnes marcadors d'inflamació (hs-PCR, Lp-PLA2, E-selectina, ICAM) i d'inhibició de la fibrinòlisis (PAI-1) amb l'evolució de la MAIC simptomàtica

Un estat proinflamatori i de fibrinòlisis defectuosa ha demostrat tenir un paper rellevant en l'aterosclerosi extracranial (313) i incrementar el risc d'ictus isquèmic en pacients amb MAIC (314,315). Per tant, els biomarcadors associats amb aquestes condicions podrien ser a priori bons candidats per determinar el pronòstic de la MAIC simptomàtica, una malaltia que no disposa actualment d'un adequat control evolutiu.

PCR:

La PCR ha estat associada tant experimental com clínicament amb la trombosis i la inestabilitat de placa ateroscleròtica (148,186).

Els nostres resultats estan en línia amb els estudis previs on nivells de PCR incrementats han predit futurs esdeveniments vasculars i ictus d'etiologia ateroscleròtica (164,316), tot i que només amb una capacitat modesta en pacients amb un elevat nombre de FRCV.(317,318)

E-selectina i ICAM-1:

Tal com s'ha comentat en l'apartat 1.2.2., es creu que aquestes molècules d'adhesió cel·lular contribueixen a la formació de la lesió ateroscleròtica i a la ruptura de la placa (150,319,320).

Els nostres resultats indiquen que l'E-selectina pot jugar un paper en la malaltia ateroscleròtica intracranial i que la seva concentració en sang pot tenir una funció pronòstica en els pacients amb MAIC simptomàtica.

Lp-PLA2:

Nombrosos treballs coincideixen en atorgar a la Lp-PLA2 un alt valor pronòstic en la predicció del risc vascular en tots els territoris arterials. Les nostres observacions

reforcen aquesta hipòtesi suggerint a més que aquest enzim pot utilitzar-se per avaluar el risc vascular per esdeveniment cerebrovasculars o IAM en pacients amb MAIC simptomàtica.

En la nostra cohort, l'activitat de la Lp-PLA2 es va associar amb l'extensió de la MAIC i el risc de recurrència d'episodis isquèmics, però no amb la progressió de les estenosis. Això suggeriria un possible mecanisme d'inestabilització de placa com a causa de les recurrències i seria concordant amb estudis previs on la Lp-PLA2 no s'ha correlacionat amb l'IMT o la presència de plaques arterioscleròtiques (321), però sí amb plaques simptomàtiques juntament amb els seus metabòlits inflamatoris (322).

Els nivells de massa i activitat de la Lp-PLA 2 en la nostra cohort han estat similars als d'altres estudis que utilitzaren els mateixos mètodes (217). A més, d'acord amb la literatura publicada, hem trobat nivells d'activitat de la Lp-PLA2 més alts en homes (en relació el suposat efecte protectors dels estrògens (200)) i nivells més baixos de Lp-PLA2 en pacients tractats amb estatines així com, sorprenentment, també en pacients tractats amb clopidogrel. L'acció del clopidogrel sobre la concentració de Lp-PLA2 no ha estat mai documentada i precisaria de més estudis per descartar potencials factors confusos (altres tractament, etc.).

Els nostres resultats indicarien a més que l'activitat de la Lp-PLA2 és millor factor pronòstic que la massa de la Lp-PLA2. Aquest fet ha estat també observat en varis estudis previs (323-325). Tot i així, un meta-anàlisi amb els estudis prospectius més rellevants combinant esdeveniments CV primaris i secundaris observà que el risc relatiu per ictus isquèmic era subtilment més rellevant per la massa (risc relatiu 1.14 (95% CI 1.02-1.27)) que per l'activitat (risc relatiu 1.08 (95% CI 0.97-1.2)) de la Lp-PLA2, tot i no trobar diferències en la significació per cardiopatia isquèmica i mortalitat vascular (217). Això podria indicar que l'activitat és més rellevant en pacients amb malaltia ateroscleròtica cerebrovascular i múltiples FRCR com en el cas de la nostra població. També s'han descrit variacions en la capacitat predictiva de la Lp-PLA2 en funció dels nivells de LDL (204). No obstant això, en la present tesi no hem pogut realitzar un subanàlisi en funció dels nivells de LDL degut la mida mostral de la població estudiada.

PAI-1:

Estudis previs del nostre grup han observat l'associació de la PAI-1 amb la progressió de la MAIC (232).

Tanmateix, varis estudis epidemiològics han observat que la capacitat predictiva de la PAI-1 plasmàtica es troba molt reduïda després d'ajustar pels FRCV i especialment pel SMet (239,326). En el quart article d'aquesta tesi constatem però, que la concentració de PAI-1 es comporta com un potent predictor de risc independent dels FRCV i els biomarcadors d'inflamació en pacients amb MAIC amb nombrosos FRCV. Això indicaria que a més de la inflamació, la inhibició de la fibrinòlisis juga un paper important en la recurrència d'ictus en aquests pacients.

Les estenosis intracranials poden progressar a expenses del creixement de la placa ateroscleròtica subjacent, al seu torn secundari al dipòsit de material lipídic, infiltració per cèl·lules inflamatòries, proliferació de cèl·lules musculars llises i/o hipertrofia fibrosa de la íntima en proporció diversa segons el cas. Les estenosis però també poden créixer mitjançant el dipòsit de material trombòtic des de la superfície de la placa cap a la llum (327). Cal tenir en compte que la progressió de les estenosis intracranials arterioscleròtiques per qualsevol dels dos mecanismes es indistingible pels estudis de DTC i les diferents tècniques angiogràfiques utilitzades en els treballs d'aquesta tesi.

En estudis previs del nostre grup, la progressió de les estenosis intracranials va demostrar ser més rellevant que l'extensió inicial de la malaltia alhora de predir el risc de recurrència clínica (73,232). En aquest sentit, en el segon treball d'aquesta tesi trobem una relació entre l'activitat de la PLA2 i l'extensió de la malaltia expressada pel nombre d'estenosis intracranials. La resta de biomarcadors inflamatoris i d'inhibició de la fibrinòlisis estudiats es van comportar més com a marcadors de la dinàmica i complicació de la malaltia. Així, en els nostres pacients es va trobat una relació entre la progressió de les estenosis intracranials i les concentració en sang de hs-PCR, PAI-1 i E-selectina de forma independent als FRCV. Això ja havia estat observat en altres territoris vasculars (veure apartat 1.2.1.) i en un estudi previ del nostre grup sobre aquesta mateix cohort de pacients (232). A més, la hs-PCR i la PAI-I en nivells

superiors a 5.5 mg/L i 23.1 ng/mL respectivament, predeien la progressió de les estenosis intracranials de forma independent a la resta de biomarcadors (232).

En altres territoris arterials s'ha suggerit que el predomini dels mecanismes trombòtics sobre els inflamatoris donaria lloc a una aterosclerosi avançada i extensa amb estenosis greus degut al creixement accelerat de les plaques. En canvi, una major participació dels mecanismes inflamatoris s'associaria al desenvolupament de plaques menys estenosants, si bé més dinàmiques i vulnerables, en part per la major intervenció dels processos de remodelació del vas (4). Les plaques ateroscleròtiques inestables amb un ric component inflamatori s'han trobat amb poca freqüència en els grans vasos intracranials i s'ha suggerit que el procés d'aterosclerosi en les grans artèries intracranials pot tenir característiques diferencials (328). En aquest sentit, si bé s'ha descrit l'existència de plaques inestables en les artèries intracranials, semblava que en aquesta localització eren més habituals les plaques fibroses i estables amb dipòsit de material fibrinoplaquetar sobre la seva superfície. El fet de que les estenosis progressin menys sota tractament anticoagulant (71) invitaria a pensar que la progressió es realitzaria predominantment a expenses del dipòsit de material trombòtic sobre la superfície d'aquestes plaques fibroses. Aquest extrem seria concordant amb el paper d'inhibició de la fibrinòlisis de la PAI-1 i l'observació en la nostra cohort d'una associació entre els nivells elevats de PAI-1 i la progressió de les estenosis intracranials. Per contra, els resultats del segon i quart articles de la present tesi suggereixen que també la inflamació (expressada pels nivells de hs-PCR i E-selectina) participa en la progressió de l'aterosclerosi intracranial (adaptat d'Arenillas, Tesis doctoral 2003 (17)).

En els diferents articles d'aquesta tesi, les anàlisis de supervivència van evidenciar una proporció de pacients amb nous episodis CV (ictus o coronaris) significativament major entre els pacients amb una concentració de hs-PCR superior a 4.9 mg/l i amb nivells d'activitat de la Lp-PLA2 superiors a 153.4 nmol/ml/min. Centrant-nos exclusivament amb l'aparició de nous ictus isquèmics (quart article), es va trobar una proporció significativament major en aquells pacients amb nivells elevats d'ICAM-1, E-selectina i PAI-1. Finalment, en els models de regressió logística ajustats per les característiques demogràfiques i els FRCV, l'activitat de la Lp-PLA2 va mantenir una associació independent amb la recurrència d'esdeveniments isquèmics, i la PAI-1 i l'E-selectina amb la d'ictus isquèmic. Afegir que en una publicació prèvia del nostre grup (164) amb lleus variacions en la cohort i els períodes de seguiment, s'havia observat també una

associació de la hs-PCR a nivells elevats (>14.1 mg/l) amb la recurrència d'ictus. Tot això indica la utilitat pronòstica d'aquests biomarcadors d'inflamació i d'inhibició de la fibrinòlisis en pacients amb MAIC.

Cal remarcar però que, al estudiar de forma conjunta tots els biomarcadors, la PAI-1 fou l'únic en predir la recurrència d'ictus de forma independent a la resta, amb un risc 16 vegades superior en els pacients amb nivells de PAI-1 per sobre de 22.5 ng/ml. Això, es deu en part a l'associació que tenen els diferents biomarcadors entre ells, però destaca igualment a la PAI-1 com el més robust de tots.

A més, trobem que al incloure la progressió per Doppler TC en el model, la PAI-1 és també l'únic biomarcador que es manté com a factor independent de recurrència d'ictus (HR 8.40, 95% CI 1.07–65.82; $p=0.043$) (dades no publicades). Això indicaria que la PAI-1 aporta informació addicional a la progressió de les estenosis per determinar la seva propensió a esdevenir simptomàtiques.

En resum, de l'anàlisi conjunt dels treballs d'aquesta tesi es desprèn la idea sintètica que, **en la progressió i complicació de la MAIC intervenen tant mecanismes trombòtics com inflamatoris de manera similar a altres territoris vasculars**. A més, **la PAI-1 es comporta com un potent predictor de nous ictus isquèmics** amb independència dels FRCV, biomarcadors d'inflamació i de la progressió de les estenosis. Això indica que **la inhibició de la fibrinòlisis juga un paper important en aquesta malaltia**, mentre que el valor pronòstic de marcadors d'inflamació clàssics com la PCR es dilueix en pacients amb malaltia ateroscleròtica severa, assolint significació només a nivells molt elevats (164).

Implicacions:

Els marcadors d'inflamació i alteració de la fibrinòlisis podrien servir per identificar pacients amb MAIC d'alt risc. Això pot tenir les següents implicacions:

1. Aquest pacients d'alt risc podrien beneficiar-se d'un maneig preventiu més intens per optimitzar els FRCV. És sabut que la dieta, l'exercici físic, l'abandonament del tabac, el consum moderat d'alcohol o el control de la hiperglucèmia, el sobrepès i altres components del SMet són capaços de reduir les xifres de PCR, PLA2 i PAI-1.

L'avaluació periòdica d'aquest biomarcadors pot ajudar també a millorar l'adherència i motivació d'aquests pacients.

2. Aquests marcadors poden ser útils per decidir el tractament més idoni i per monitoritzar-ne l'eficàcia. En els pacients amb un major component inflamatori, estarien justificats fàrmacs capaços d'estabilitzar la placa. Pel contra, els pacients amb estenosis constituïdes majoritàriament per plaques fibroses estables es beneficiarien menys en teoria, dels fàrmacs antiinflamatoris. Amb les tècniques diagnòstiques actuals encara estem lluny de poder discriminar entre un tipus i altra de placa i el desenvolupament de mètodes d'imatge que permetin fer aquesta distinció és de gran importància. Suggerim que la PLA2, l'E-selectina i l'ICAM-1 podrien ser d'ajuda alhora d'identificar els pacients amb plaques amb una major activitat inflamatòria i la PAI-1 el predomini d'un estat protrombòtic.

En aquest sentit, hi ha evidència en alguns assajos que els nivells de hs-CRP poden ser utilitzats per predir la resposta a agents antiagregants, incloent l'aspirina, clopidogrel i abciximab i que el benefici de l'aspirina es constata primàriament en aquells pacients en el quartil més alt de hs-PCR (153). Igualment, els tractaments amb ARA-II o estatines disminueixen els marcadors inflamatoris i el risc independentment dels nivells lipídics (329,330). Per altra banda, l'atorvastatina ha mostrat ser l'estatina més eficaç per reduir la Lp-PLA2 (331) i els fibrats, niacina, àcid nicotínic, azetidionones i el darapladib poden també reduir els nivells i l'activitat de la Lp-PLA2 (332,333). També hi ha nombrosos fàrmacs que incrementen indirectament l'activitat fibrinolítica mitjançant la reducció dels nivells de PAI-1 com els hipoglucemians, hipolipemians, IECA i la teràpia hormonal substitutiva en les dones (334-337).

3. Tenint en compte que aquests biomarcadors han estat proposats com a mediadors directes de l'aterogènesi i les seves complicacions, la seva inhibició pot suposar una aproximació terapèutica en el futur.

En aquest context, la PAI-1 hauria de ser considerada una molècula diana que mereix més atenció. Uns pocs estudis han demostrat que els efectes antitrombòtics de la inhibició de la PAI-1 aconsegueixen incrementar l'activitat fibrinolítica endògena sense afectar la coagulació ni la funció plaquetària (338,339). Els inhibidors de la PAI-1 podrien ser una nova classe de fàrmacs antitrombòtics amb un índex terapèutic més ampli i amb menys limitacions que els antiagregants i anticoagulants convencionals.

Cal tenir en compte però que les investigacions presentades en aquesta tesi no permeten establir si les associacions són de significació causal. A més, en un estudi previ del

nostre grup no es va trobar relació entre la progressió de les estenosis intracrànials i els diferents tractament mèdics incloent els antiagregants i estatines (232). En aquest context l'impacte potencial d'aquests i altres tractaments sobre aquests biomarcadors hauria de ser estudiat en assajos clínics aleatoritzats.

5.3. Paper del polimorfisme C1444T de la PCR en el pronòstic dels pacients amb MAIC simptomàtica

Diversos SNP i haplotips del gen de la PCR han estat associats amb els nivells de PCR i el risc d'esdeveniments CV (182,316,340,341). Un dels primers descrits va ser l'al·lel T en el SNP C1444T, el qual s'ha trobat associat amb concentracions més altes de PCR tant en condicions basals com després d'estímuls inflamatoris (310,342).

En el nostre estudi, la presència de l'al·lel T en el SNP C1444T es va trobar associat amb a una major recurrència d'esdeveniments isquèemics independentment dels FRCV i els nivells de PCR. A més, s'observà un efecte sinèrgic en l'increment del risc al associar-se aquest al·lel amb nivells de PCR superiors a 4.9 mg/l. Això recolza la idea que part del risc incrementat de recurrència atribuït a la PCR (164,232) pot estar mediat genèticament.

El significat real d'aquesta associació no està del tot clara. El polimorfisme estudiat podria afectar directament l'expressió del gen de la PCR o estar en desequilibri de lligament amb altres polimorfismes o grup de polimorfismes responsables d'una proporció rellevant del fenotip. En aquest context, el C1444T SNP, localitzat en una regió sense traduir del gen de la PCR és probable que, més que un paper funcional, estigui en desequilibri de lligament amb altres variants genètiques realment responsables de l'associació entre el genotip de la PCR i els esdeveniments CV. En aquest sentit, Kovacs i col·laboradors (343) trobaren per exemple que el polimorfisme -286(C>T>A) de la regió promotora de la PCR tenia un fort desequilibri de lligament amb la variant +1444 C>T aquí estudiada. Calen doncs més investigacions per determinar la variant funcional en el locus de la PCR tot i que també sembla probable que SNP específics representin només una part de tota la variació genètica que pot contribuir a les variacions fenotípiques. Així doncs, els nostres resultats necessitarien

ser replicats amb un *screening* de tot el gen de la PCR utilitzant tècniques de mapatge d'haplotips capaces de capturar la diversitat genètica de la mostra.

La manca d'associació entre el SNP C1444T i les concentracions de PCR en el nostre estudi està en línia amb altres series més extenses, on la raó de risc per nous esdeveniments CV en funció del genotip de PCR només s'atenuava lleument al ajustar-la pels nivells de PCR (182). Per contra, en altres estudis el genotip de la PCR estava més fortament associat amb les concentracions plasmàtiques de la proteïna que amb el risc d'IAM o ictus (181,344). Les possibles explicacions d'aquestes observacions discrepant inclouen les següents possibilitats: la influència dels FRCV i la variabilitat individual en els nivells de PCR pot ser més important que l'atribuïda a les variants genètiques (182,345,346,347); la PCR circulant mesurada en un únic punt temporal pot no reflectir el dany inflamatori acumulat; les variacions genètiques poden afectar els nivells de la PCR en resposta a estímuls inflamatoris en major mesura que els nivells en estat basal (342,348), essent aquesta resposta més rellevant pel risc vascular; la variabilitat genètica pot determinar canvis en l'estructura i conformació de la PCR que n'incrementin l'activitat sense afectar-ne els nivells; i finalment, pot ser que hi hagi un lligam entre el SNP 1444T i un locus secundari fora del gen de la PCR el qual sigui el responsable final de la repercussió clínica sense tenir relació amb la proteïna ni els seus nivells. En tot cas, el baix nivell de desequilibri d'enllaç entre la transcripció estructural del gen de la PCR i els gen flanquejants observat en dades del Hap-Map fa improbable aquest últim extrem (182).

Les nostres troballes indiquen doncs que els estudis d'associació genotip PCR-nivells de PCR-malaltia CV poden ser més complexos d'interpretar del que s'havia suposat (349-351).

Implicacions:

L'al·lel T del SNP C1444T de la PCR pot fer al pacient més susceptible a patir complicacions en la MAIC simptomàtica. Caldria doncs tenir en compte aquest SNP com a determinant pronòstic d'aquesta malaltia.

Es reforça la hipòtesi que més enllà de l'estil de vida i els FRCV (6) existeix una susceptibilitat genètica en la MAIC que explicaria, per exemple, les diferències observades entre diferents ascendències i ètnies (56).

Si la PCR està realment implicada en el risc d'esdeveniments isquèmics, ser portador d'un al·lel que suposa una major elevació acumulada de PCR en el temps pot ser més important que les determinacions puntuals dels nivells de PCR en sang. En canvi, si el risc CV és independent dels nivells plasmàtics acumulats o bé la PCR és simplement un marcador sense implicació fisiopatològica directa, els seus nivells en sang poden reflectir diferents graus de malaltia inflamatòria en funció del genotip. Això faria necessari considerar l'efecte del genotip en els punts de tall proposats de PCR, per exemple per escollir els candidats a tractament amb estatines (99,165,167).

En tot cas, la recerca genètica representa una prometedora eina pels pacients amb MAIC i l'aparició de noves tecnologies de diagnòstic genètic com el *genome-wide association study* o el *exome sequencing* ofereixen grans expectatives per identificar nous gens que es sumin al de la PCR. De totes maneres és fonamental reconèixer que es requereixen estudis d'associació genètica amb un poder adequat per provar aquesta hipòtesi.

5.4. Relació de les CPE i els AGF amb la MAIC i la seva gravetat

En el tercer estudi d'aquesta tesi, no es van trobar diferències en la concentració de CPE (CD34+/KDR+) circulants ni de cèl·lules CD34+ (una població de cèl·lules progenitores més immadures i genèriques) entre pacients amb MAIC i els controls sans. Factors com l'edat, el sexe i diversos fàrmacs podrien haver influït en aquest resultat (301,352). En tot cas, no es van trobar diferències en els nivells de CPE circulants en els pacients tractats amb estatines, antiagregants o altres fàrmacs i, tot i que el nombre de dones era major en el grup control, en el grup de pacients només es van incloure dones post menopàusiques que no prenen tractament hormonal substitutiu (299,352). Això reforça la idea que les CPE no estan elevades durant la fase crònica de l'ictus ateroscleròtic. A més, es va reafirmar que els pacients amb un major nombre de FRCV tenen nivells més baixos de CPE, quelcom ja conegut.

Cal destacar la constatació de concentracions més elevades de les CPE en pacients amb un major nombre d'estenosi intracranials. Això podria suggerir un balanç entre la isquèmia crònica, estímul capaç d'induir la mobilització de CPE, i la malaltia ateroscleròtica, associada com em dit a un menor nombre de CPE circulants.

Concordaria a més amb anteriors treballs, que han observat un major nombre de CPE en pacients amb causes no arterioscleròtiques d'estenosis intracranials, com la malaltia de

moyamoya que en pacients amb malaltia cerebrovascular ateroscleròtica (292,353). En resum, tot i no estar incrementada respecte als controls sans, la mobilització de les CPE sembla parcialment preservada en la MAIC en presència d'un potencial major estímul hipòxic.

En alguns estudis el nivell de cèl·lules CD34+ ha demostrat correlacionar-se millor amb paràmetres CV i el risc vascular que diferents fenotips de CPE (354). En el nostre estudi però observem una millor associació entre l'extensió de la MAIC i els fenotips de CPE. En quant als AGF relacionats amb les CPE, es van obtenir nivells de FGF, VEGF i PDGF-BB més baixos en els pacients que en els controls. Indicadors d'un major estímul isquèmic cerebral, com les estenosis intracranials greus, s'associaren també amb nivells més alts d'aquests AGF. Això suggereix que la resposta angiogènica a la isquèmia està igualment parcialment conserva en pacients amb MAIC sense assolir els nivells de la població sana. Així, una disfunció paracrina en els teixits arterioscleròtics o en les pròpies CPE, podria ser en última instància la causa de la mobilització parcialment disminuïda de les CPE.

Finalment, es va constatar a més una falta de correlació entre els nivells dels AGF i la concentració de les CPE en els pacients amb MAIC, tot i que sí que hi havia una correlació entre els nivells de FDF i les CPE en els controls. Altres autors han informat de resultats similars (292,355). Això podria explicar-se per una resposta disfuncional de les CPE als AGF en el context de la malaltia ateroscleròtica i/o a la producció d'AGF per altres fonts en el vas diferents de les CPE.

Cal tenir en compte però que en el nostre estudi s'han identificat associacions i no relacions causals i que calen estudis de major mida amb un disseny adequat per confirmar aquestes associacions. També cal tenir en compte que en el nostre estudi no s'ha avaluat la viabilitat i capacitat funcional de les CPE mitjançant cultiu.

Implicacions:

Les CPE i els AGF poden tenir un paper en la patogènesi de la MAIC i per tant, en línia amb allò observat en altres malalties ateroscleròtiques (302,303), la teràpia angiogènica cel·lulars podria ser una eina terapèutica per aquesta malaltia en un futur.

Queden però moltes incògnites per resoldre degut a l'heterogeneïtat d'aquesta població cel·lular i a la diversitat funcional de les seves diferents subpoblacions.

5.5. Paper de l'ITB en el pronòstic de la MAIC simptomàtica

El quart treball de la present tesi, avalua el valor pronòstic de l'ITB (un test fàcil de realitzar, econòmic i incruent) en pacients d'alt risc com són els afectats per MAIC simptomàtica.

En aquesta població es va observar que un 71.6% dels pacients tenien un ITB patològic (<0.9), estant en el 51% severament disminuït (<0.8). Això mostra novament que l'aterosclerosi és una malaltia sistèmica amb afectació de múltiples territoris vasculars. Per altra banda, només el 17.6% dels pacients informava de símptomes de malaltia vascular perifèrica.

Els pacients amb un ITB severament disminuït tenien més sovint diabetis, un $ESRS \geq 3$ i un major nombre d'estenosis intracranials. En les anàlisis de supervivència el risc de nous episodis cerebrovasculars era major en pacients amb un ITB patològic i també en aquells pacients amb claudicació intermitent.

Finalment, el model de regressió múltiple va constatar que aquells pacients amb un ITB severament disminuït (<0.8) tenien un major risc (4.6 vegades més alt) de nous episodis cerebrovasculars independentment dels FRCV i altres factors confusors. Aquesta associació no es va trobar per graus patològics menys severos d'ITB (<0.9). Aquest risc és superior al trobat en altres estudis que no avaluaven específicament ictus de causa ateroscleròtica (119,356) i confirma el valor de l'ITB patològic com a factor de risc a curt termini en pacients amb MAIC. També es reafirma que els valors severament disminuïts d'ITB (<0.8) tenen un major valor pronòstic que aquells exclusivament dins del rang patològic per malaltia arterial perifèrica (<0.9) (121).

Tot i així, de manera similar a allò observat en publicacions prèvies (119,121), l'ITB no va demostrar en la nostra cohort tenir un valor pronòstic superior a la progressió de les estenosis intracranial per DTC en el model de regressió (dades no publicades).

A més, en la nostra població els pacients amb un $ITB < 0.8$ no tenien nivells més alts dels biomarcadors d'inflamació, la qual cosa pot indicar que ambdós paràmetres poden aportar informació complementària: l'ITB com a marcador d'aterosclerosi estesa i els biomarcadors d'inflamació com a indicadors de desestabilització de placa ateroscleròtica.

Implicacions:

La capacitat pronòstica de l'ITB pot utilitzar-se en els pacients amb MAIC per avaluar el risc vascular, especialment si no és possible monitoritzar l'evolució de les estenosis intracranials, i pot ser útil pel consell mèdic i per determinar la necessitat d'altres tests diagnòstics.

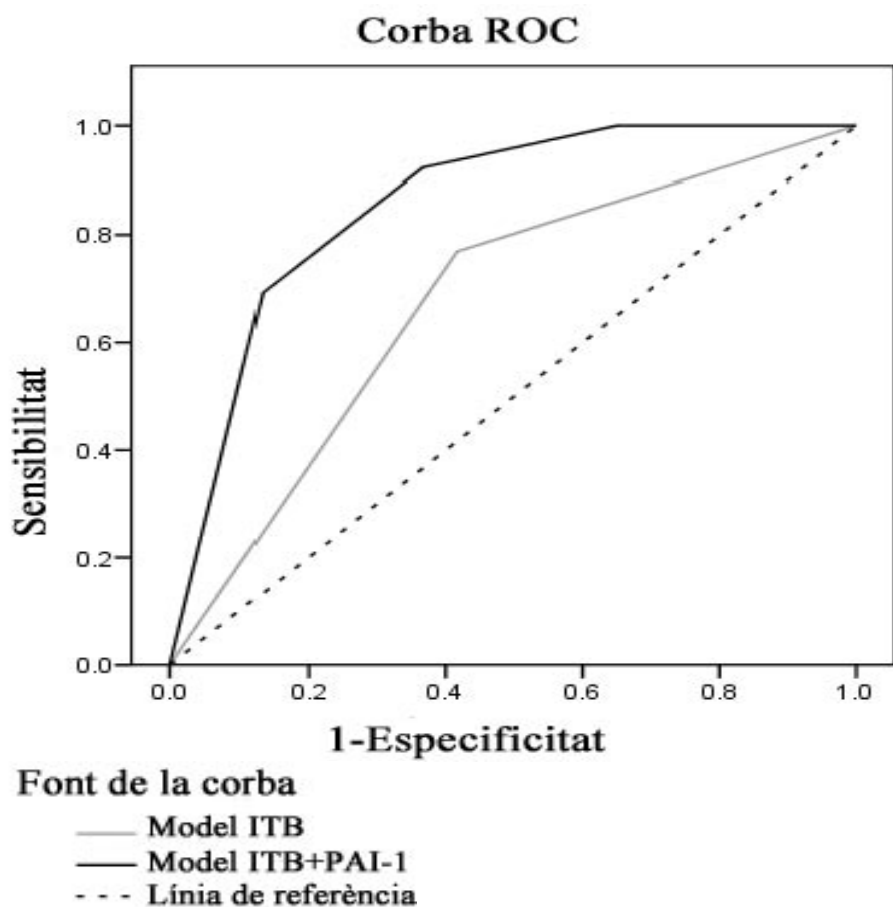
A part de per identificar pacients asimptomàtics amb risc incrementat de malaltia coronària i ictus, tal i com proposen les guies de la AHA (110), l'ITB serveix per avaluar el risc de pacients amb MAIC simptomàtica.

5.6. Combinació dels biomarcadors d'inflamació i inhibició de la fibrinòlisis amb escales clíniques pronòstiques de risc de recurrència d'ictus (ESRS) en pacients amb MAIC simptomàtica

En la nostra població amb MAIC, l'anàlisi de supervivència va mostrar que el risc de nous episodis cerebrovasculars era major en pacients amb un $ESRS \geq 3$. A més, al associar aquesta escala clínica amb els nivells de PAI-1 es va observar un increment de l'AUC per la capacitat predictiva de l'ESRS i una milloria significativa (del 19.6%) en la capacitat discriminativa segons el mètode estadístic *Integrated Discriminator Improvement* (311).

Finalment, es va comprovar que la capacitat de discriminació predictiva de l'ITB millorava significativament (un 21.6%) al combinar-se amb un marcadors biològic d'inhibició de la fibrinòlisi com la PAI-1 (**Figura 19**).

Figura 19. Àrees sota la corba dels models d'ITB i ITB més PAI-1 per risc d'esdeveniments cerebrovascular.



Implicacions:

Els biomarcadors circulants podrien utilitzar-se per millorar escales pronòstiques clíniques basades en factors de risc establerts com l'ESRS. Això pot permetre:

1. Optimitzar les pautes de tractament preventiu i la seva relació cost-benefici. Així, per exemple, anàlisis retrospectives han observat que una teràpia combinada de dipiridamol i aspirina (87) o de clopidogrel en monoteràpia (357), pot ser més beneficiosa en pacients d'alt risc segons l'ESRS. Igualment, s'ha suggerit que els tractament endovasculars poden ser beneficiosos en poblacions amb un risc anual superiors al 3.4% (93), risc equivalent a un $ESRS \geq 3$ en els estudis de validació d'aquesta escala (111).
2. Millorar la randomització en assajos clínics per comparar diferents estratègies terapèutiques.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi són:

6.1. Proteïnes: Els nivells plasmàtics elevats de biomarcadors d'inflamació (PCR, Lp-PLA2, E-selectina) i inhibició de la fibrinòlisis (PAI-1) incrementen el risc de recurrència d'ictus i esdeveniment isquèmic en la malaltia ateroscleròtica intracranial simptomàtica. Els factors angiogènics estan disminuïts en aquests pacients i s'incrementen amb la gravetat de la malaltia.

6.2. Gens: El polimorfisme C1444T de la PCR incrementa el risc de recurrència d'esdeveniment isquèmic en pacients amb malaltia ateroscleròtica cerebral simptomàtica.

6.3. Cèl·lules: En els pacients amb malaltia ateroscleròtica cerebral, els nivells de CPE son similars als controls sans tot i que s'incrementen amb l'extensió de la malaltia i la seva capacitat funcional podria estar compromesa.

6.4. Clínica: L'ITB patològic es relaciona amb un increment del risc de recurrència d'ictus en pacients amb malaltia ateroscleròtica intracranial simptomàtica.

6.5. Models de predicció: Els biomarcadors d'inhibició de la fibrinòlisi (PAI-1) milloren les escales clíniques de risc de recurrència d'ictus (ESRS) i la informació pronòstica aportada per l'ITB.

7. ANNEX

Predictive value of ankle-brachial index and PAI-1 in symptomatic intracranial atherosclerotic disease recurrence.

Massot A., MD²; Giralt D.²; Penalba A.²; Garcia-Berrocoso T.²; Navarro-Sobrino M., PhD²; Arenillas J.F., MD, PhD³; Ribó M., MD, PhD¹; Molina A.C., MD, PhD¹; Alvarez-Sabín J., MD, PhD¹; Montaner J., MD, PhD^{1,2}; Delgado P., PhD²

Neurovascular Unit¹ and Neurovascular Research Laboratory², Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain. Neurovascular Unit³, Stroke Unit, Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain.

Correspondence to:

Pilar Delgado

Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute

Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain

Tel. +34934894029

Fax. +34934894015

pilar.delgado@vhir.org

Abstract

Background and purpose: Strokes due to intracranial atherosclerotic disease (ICAD) have a high risk of stroke recurrence. Essen Stroke Risk Score (ESRS), low ankle-brachial index (ABI) and several biomarkers have been associated with the risk of recurrent cerebrovascular events (CVEs) in stroke patients. We prospectively examine their single and combined predictive value in a cohort of first-ever transient ischemic attack (TIA) or stroke related to ICAD.

Methods: In 102 ICAD first ever stroke patients, ABI was measured 3 months after TIA or stroke together with CRP, Lp-PLA2, ICAM-1, E-selectin and PAI-1 measurements in 73 of them. During follow-up, the presence of new CVEs was assessed every six months.

Results: After a median follow-up of 21.5 months, sixteen patients (16%) suffered a new stroke or TIA. Among all baseline clinical factors and ESRS, severely-lowered ABI (<0.8) was the most powerful factor to independently predict further stroke/TIA (HR 4.63; 95% CI 1.32-16,24; p=0.017), which were also predicted, together with decreased ABI, by PAI-1 levels (HR 16.41; 95% CI 2.13 to 126.52; p=0.007) when the studied biomarkers were added to the model. The combination of ABI and PAI-1 resulted in an integrated discrimination gain of 21.6% (p<0.001).

Conclusions: ABI and PAI-1 predict the risk for new CVEs in symptomatic ICAD patients, improving the identification of high-risk patients. This might be useful in the evaluation of vascular risk in ICAD patients.

Introduction:

Predictive models are still hardly used in treatment decisions following stroke or transient ischemic attack (TIA).

Intracranial atherosclerotic disease (ICAD) is an important cause of ischemic stroke (IS) with an especially high annual recurrence rate ($\approx 14\%$) despite best antithrombotic and endovascular treatments.¹ This unacceptable prognosis could be improved through the recognition of patients at increased risk of recurrence who would benefit from more active diagnostic and therapeutic interventions.

To that purpose, several clinical scores have been created.² Essen Stroke Risk Score (ESRS) is a linear 10 point scale that predicts short term risk of recurrent IS based on clinical items, distinguishing between low (score 0–2) and high risk categories (≥ 3).³

Also markers of inflammation and impaired fibrinolysis such as high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP), lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (E-selectin) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), have the ability to predict cardiovascular events and stroke independently of cardiovascular risk factors (CVRF).^{1,4-7}

Finally, low ankle-brachial index (ABI), an easy to use tool to identify patients with atherosclerotic burden, has also been associated with increased recurrent rates of vascular events and stroke in IS patients.^{2,8-11} Although its predictive value in a cohort of particularly high-risk patients as those with stroke related to ICAD remains to be evaluated to our knowledge.

The aims of the present study are to examine ABI prognostic value in the prediction of recurrent stroke in an ICAD-related first-ever stroke population, compare ABI with other well known risk markers, such as ESRS and biomarkers, and evaluate if their combination increase their prognostic ability.

Subjects and methods

Between April 2002 and July 2004, 181 consecutive TIA or IS patients admitted to our Stroke Unit showed intracranial stenoses potentially responsible for the cerebral ischemic event on TCD recordings. Our diagnostic protocol has been reported in detail elsewhere.¹² After diagnostic work-up, 79 patients had to be excluded because of the following reasons: absence of angiographic confirmation (n=11); nonsymptomatic

intracranial stenoses (n=7); presence of severe ipsilateral cervical internal carotid artery (ICA) stenoses (n=15); emboligenic cardiopathy (n=19); nonatherosclerotic causes such as Sneddon syndrome, moyamoya disease, and vasculitis (n=6); placement of stents (n=3); neoplasm (n=7); stroke-related death or severe disability (n=10); and denial of informed consent (n=1). At the inclusion visit, performed 3 months after the qualifying event, informed consent, ABI and blood samples were obtained from 102 patients.

Clinical variables, ultrasound protocol and long-term follow-up

A detailed medical history of vascular CVRF and secondary preventive therapies were registered as previously described.⁴

Transcranial and carotid ultrasonographic examinations were performed by an experienced stroke neurologist who remained unaware of the clinical data. Our Transcranial Doppler (TCD) protocol and definitions of intracranial and ICA stenoses has been reported in detail elsewhere.¹

Patients were visited every 6 months by a stroke neurologist who registered the appearance of the following predefined clinical end points: IS, TIA diagnosed by a stroke neurologist, myocardial infarction (MI) or angina requiring hospitalization, and vascular death.

Ankle-brachial index determination:

For ABI measurement, a standard sphygmomanometer and a Doppler device (continuous-wave Doppler ultrasound device, Elektronische Systeme GmbH, Germany) with an 8-MHz continuous-wave probe was used. The blood pressure (BP) cuffs were placed over each brachial artery and above each malleolus. The systolic pressure (point it first became audible) was measured once in each of the following right and left arteries: brachial artery, anterior tibial artery and posterior tibial artery.

According to the current guidelines of the American Heart Association (AHA) and the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II), ABI was calculated for each side as the ratio of the highest systolic BP of the 2 ankle arteries of that limb (either anterior or posterior tibial arteries) and the highest systolic BP of the upper limbs.¹³

The lowest of the right and left ABI values was used to classify the participant into an ABI category.

Four ABI categories were defined: Severely-lowered as ABI <0.8, mildly-lowered as ABI between 0.8–0.89, normal as ABI 0.9–1.3 and high (possibly indicative of calcified lower limb arteries) as ABI >1.3.⁹

Essen Stroke Risk Score:

The ESRS is a sum score calculated as follows: 2 points for age >75 years, each 1 point for age >65–75, arterial hypertension, diabetes mellitus, previous MI, other cardiovascular disease (except atrial fibrillation), peripheral arterial disease (PAD), current or past (<5 years) smoking and previous TIA or IS in addition to qualifying event.²

Patients were categorized as low risk when ESRS was <3 points, high-risk when ESRS was 3-6 and very high-risk if it was >6 points.

Blood Sampling and Biomarkers determination:

Peripheral blood samples were drawn after overnight fasting. In order to avoid acute-phase changes, infections, surgery or trauma during the previous 3 months were ruled out by a careful medical history and physical examination prior to sampling. In 29 patients determination was not performed because of illnesses that could affect biomarkers blood levels (chronic inflammatory diseases (n=7), chronic renal failure (n=3) or lack of an adequate acoustic window (n=19) regarding the inclusion protocol of a previous study.¹² Finally, samples were collected in 73 patients in EDTA or citrate-containing tubes and tubes with no anticoagulant as appropriate. Serum or plasma were extracted after 15 minutes centrifugation (3500 rpm at 4 °C), blind coded and then frozen at -80°C until testing was performed.

These 73 patients had participated in a previous cross-sectional study by our group.¹² This study was approved by the local ethics committee.

The molecular markers evaluated in this study were hs-CRP, ICAM-1, E-selectin, Lp-PLA2 mass and activity and PAI-1. Lp-PLA2 was assayed in plasma-EDTA, PAI-1 in plasma-citrate and hs-CPR, ICAM-1 and E-selectin in serum.

The techniques used for these biomarker's assays have been reported in detail in previous publications.^{1,12} All assays were performed blinded to clinical data.

Statistical Analysis

Analyses were performed with the SPSS statistical package (Chicago, Ill., USA), version 15.0. Normality for continuous variables was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance for intergroup differences was assessed by the χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables and by the T-test, ANOVA, Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis test for continuous variables. The correlations between continuous variables were determined with Spearman's or Pearson's coefficients, as appropriate. To prevent over modeling of the data and false-positive results, only cerebrovascular recurrence was considered an end point of the study. The relationship between pathologic ABI and biomarkers levels with the occurrence of new cerebrovascular events (CVEs) was evaluated by means of a Kaplan-Meier curve (log-rank test). A p value <0.05 was considered significant. When appropriate, receiver operating characteristic curves were configured to establish the cutoff point of each biomarker that optimally predicted clinical recurrence.

Furthermore, a Cox proportional hazards multivariate analysis was used to identify clinical predictors of further events during follow-up, in which age, sex, hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia and variables showing p values <0.05 on univariate testing were included. Molecular markers were later on added to the clinical model to configure a clinical-biological model. Results were expressed as adjusted hazard ratios (HR) and corresponding 95% confidence intervals (CI). In order to compare predictions given by both models (clinical versus clinical plus biomarkers model) we used the Area Under the Curve (AUC) of each model by medical software. Finally, IDI (Integrated Discriminator Improvement) and NRI (Net Reclassification Index)¹⁴ were performed using R software (packages Hmisc and PredictABLE) to assess the percentage of improvement with the clinical plus biomarker model as compared with only clinical model and the percentage of reclassification considering three groups of probabilities for recurrence (<10%, 10-90%, >90%).

Results:

Baseline Clinical Variables:

Baseline characteristics and CVRF profile of the study population are shown in table 1. The study sample consisted of 69 men (67.6%) and 33 women (32.4%). Median age was 66.8±8.9 years. The qualifying event attributable to a symptomatic intracranial

atherostenosis was an IS in 80 patients (78.4%) and a TIA in the remaining 22 (21.6%). The symptomatic lesion was located in the ICA in 20 patients (19.6%), in the middle cerebral artery in 41 (40.2%), in the anterior cerebral artery in 2 (2%), in the posterior cerebral artery in 11 (10.8%) and in the vertebrobasilar system in 18 (17.6%). In 10 patients (9.8%) with multiple stenoses it was not possible to determine which intracranial stenosis had been symptomatic. All studied subjects remained free of ischemic events during the period between hospital discharge and the inclusion visit. Regarding secondary prevention therapies, 79 patients (75.5%) received antiplatelet agents, 23 (22.5%) received oral anticoagulants agents and 2 (2%) both throughout the follow-up period; 71(69.6%) were treated with statins. Intracranial stenoses were confirmed by MRA in 89 patients (87.3%) and by CTA in 13 (12.7%). The median number of intracranial stenoses per patient was 3 (interquartile range 2–4).

Mean ABI was 0.72 ± 0.31 ; 27.5% had ABI 0.9-1.3 (normal), 20.6% had ABI 0.8-0.89 (mildly-lowered), 51% had ABI < 0.8 (severely-lowered) and 1% had ABI > 1.3 (high). Limb claudicating symptoms were present in 18 (17.6%) of the overall cohort (all with ABI < 0.8, which represents the 34.6% of patients with ABI < 0.8). Patients with severely-lowered ABI had more often diabetes mellitus ($p=0.018$), a higher ESRS ($p<0.001$) and higher number of intracranial stenosis ($p=0.09$) than those patients with normal or mildly-lowered ABI (See Table 1).

In the overall cohort, after a median follow -up of 21.5 month (IC range 12-29), 23 patients (24,5%) had vascular events which consisted in 12 (11.8%) IS, 4 (3,9%) TIA and 7 (6.9%) coronary events. Four patients died during follow-up, 2 due to fatal strokes, 1 due to MI.

Survival analyses showed that the risk of new CVEs was higher in patients with ABI severely or mildly-lowered ($p=0.008$ and $p=0.009$ respectively) as well as in patients with intermittent claudication ($p=0.004$), medical history of ischemic heart disease ($p=0.001$) and $ESRS \geq 3$ ($p=0.034$).

A multivariable Cox regression model was applied to assess for potential clinical predictors of CVEs and, after adjustment by CVRF and other potential confounders including $ESRS > 3$, severely-lowered ABI appeared as independently associated with the risk of CVEs (HR 4.63; 95% CI 1.32-16,24; $p=0.017$).

ABI and Biomarkers as Predictors of New Cerebrovascular Events:

Further, to assess the potential contribution of molecular markers to the prediction of CVEs, together with ABI determination, biomarkers already described in relation with ICAD progression and/or CVE risk were added to the model.

The 73 participants with biomarkers determination 3 month after the qualifying event were not different from the total cohort regarding baseline characteristics and CVRF profile (data not shown).

In these 73 patients, during a median follow-up time of 22.36 ± 7.55 months, 18 (24.6%) suffered a major ischemic event: 10 IS, 3 TIA and 5 coronary events. Univariate analyses showed that the risk of new CVEs was higher in patients with baseline PAI-1 >22.52 ng/ml ($p < 0.001$), E-selectin >24.75 ng/ml ($p = 0.008$), ICAM-1 >205 ng/ml ($p = 0.029$) and intermittent claudication ($p = 0.01$) as well as mildly or severely-lowered ABI (0.011 and 0.019, respectively). We observed a non-significant trend regarding hs-CRP >14.1 mg/L ($p = 0.085$).

Any of the studied biomarkers showed a significant correlation with ABI except ICAM ($r = -2.74$; $p = 0.02$). Moreover, patients with ABI <0.8 had not significant higher levels of any of these biomarkers.

Finally, taken together all clinical and biological information, both severely-lowered ABI and PAI-1 levels predicted independently the risk of having a new CVEs (HR 4.09; 95% CI 1.12 to 14.92; $p = 0.03$ and HR 16.41; 95% CI 2.13 to 126.52; $p = 0.007$ respectively). Figure 1a shows the presence of CVEs according to the combination of both predictors.

Besides, overall predictive capacity for severely-lowered ABI alone was 0.67 whereas the model including ABI plus PAI-1 reached 0.85 (p value for comparison $p = 0.05$, Figure 1b), with a discrimination gain according to IDI of 21.6% with the model including both ABI and PAI-1 than with the ABI alone ($p < 0.001$). Figure 1c NRI did not show any significant differences regarding classification between both models.

Finally, and although ESRS was not an independent predictor of CVEs in our cohort, in order to assess whether biological information was also able to improve prediction over ESRS, we compared the AUC achieved by ESRS alone (0.69) in our cohort versus ESRS plus PAI-1 (0.86). Although these differences were not statistically significant ($p = 0.09$), IDI also showed better discrimination with the ESRS plus PAI-1 levels model than with the ESRS alone (19.6% improvement, $p < 0.001$).

Discussion:

The main finding of the present study is that ICAD stroke patients with severely-lowered ABI and high levels of PAI-1 are at increased risk of stroke recurrence. Furthermore, the combination of ABI, an easy-to-perform test, with biological information improves risk stratification and might therefore help in the identification of the highest risk patients.

Epidemiological studies have demonstrated that subclinical cardiovascular disease in one vascular bed is associated with the presence of clinical disease in another bed.¹⁵ In this sense ABI<0.9, indicative of subclinical PAD,¹⁶ is recommended for the current guidelines of the AHA to identify asymptomatic patients at increased risk of coronary artery disease (CAD) and stroke.² Moreover, low ABI has demonstrated to be an independent predictor of carotid disease,^{9,16-18} ICAD¹⁰ and stroke in population with and without atherosclerotic disease.^{2,9,10,17,18}

In contrast, other studies showed none or little prognostic ability of low ABI beyond CVRFs^{9,15,17} and there are only few data suggesting low ABI as short-term prognostic factor.⁸

Actually, only 5 previous studies explored the association between ABI and outcome in patients with IS or TIA,^{2,8-11} but the results of two of them were not adjusted for CVRFs^{2,8} and another found an association with severe (<0.8) but not with mild ABI lowering (0.8-0.89).⁹

Regarding to this, it is important to emphasize that the relationship between ABI, cerebral arterial disease and subsequent vascular events is stronger at lower ABI values^{8,9,18} and that it is unlikely that ABI could predict recurrence of strokes due to cardioembolism or small vessel disease.⁹

The present study is the first to exclusively evaluate the high risk subgroup of patients with symptomatic ICAD. We found four times higher risk of recurrent CVEs among those patients with severely-lowered ABI (<0.8) but not with ABI<0.9, independently of CVRFs and as early as at the first two years from hospitalization. This risk doubles the reported in previous studies that didn't specifically studied ICAD patients.^{10,18}

However, in agreement with previous reports, ABI lowering was associated with ICAD severity (measured as number of baseline intracranial stenosis).^{9,10}

In our population, patients with ABI<0.8 had not higher levels of inflammatory biomarkers. This could point to ABI and inflammation as expressions of different

pathophysiological processes able to provide complementary information: ABI as marker of widespread atherosclerosis and inflammatory biomarkers indicating plaque destabilization.

Secondly, we studied molecules involved in different stages of the atherosclerotic process. Adhesion molecules as E-selectin and ICAM-1 are thought to contribute to atherosclerotic lesion formation and to plaque rupture.^{5,19} Regarding PAI-1, some studies have shown increased expression of this protein in atherosclerotic vessels which may cause an impaired fibrinolytic response to mural thrombi, leading it to a greater extent and persistence in the arterial lumen and to an increased exposure to clot-associated mitogens.¹²

In the present study, we show that PAI-1, E-selectin and ICAM-1 are significantly associated with stroke recurrence among patients with high atherosclerotic burden. However, only PAI-1 was independent of the remaining studied molecules and CVRFs (including severely-lowered ABI).

Previous studies by our group have already reported the association of hs-CRP and PAI-1 with ICAD progression and identified hs-CRP and Lp-PLA2 activity as independent predictors of new vascular events (AIT, stroke or MI) in ICAD patients.^{1,4,12} The variability regarding the statistical significance of hs-CRP as marker of stroke or AIT with respect to one of our previous publication⁴ is due to subtle variations in the selected cohort and follow-up periods, and supports the idea of hs-CRP having a lower prognostic value compared to PAI-1 in patients with high number of CVRF.

These biomarkers might be useful to monitor the efficacy of anti-atherosclerotic therapies such as statins, or to help optimize CVRF and metabolic control. Moreover, given that those molecules have been proposed as mediators of atherogenesis, their therapeutic inhibition may represent a promising new approach for the medical treatment of ICAD.

Lastly, scores exist for prediction of recurrent stroke² but only few have been prospectively validated to date and they are probably not accurate enough. Recently, ESRS was derived from the CAPRIE trial and validated using the data set of the European Stroke Prevention Study II and REACH Registry.²⁰ A high recurrent stroke risk in secondary prevention trials has been previously defined as $>4\%/year$, which corresponds to an $ESRS \geq 3$ in these trials.²⁰

Improvement of clinical models performance by circulating biomarkers has already been proposed as appropriate in CAD patients.²¹ With the same aim, in our study ESRS and ABI predictive capacity, showed a better discrimination combined with PAI-1.

Regarding the combination of ESRS and ABI, previous studies did not show an improvement in the overall predictive power, but it may be due to that they both share information (intermittent claudication as an ESRS item). However, considering the high number of asymptomatic patients with severely-lowered ABI in our population, our results support ABI testing in stroke patients with ICAD, in order to refine risk assessment of further events.

A better stratification of patients may possibly lead to further optimized treatment regimen. Accordingly, retrospective analyses have suggested that a combination therapy of dipyridamole/acetylsalicylic acid or clopidogrel monotherapy, compared with aspirin alone, may be particularly beneficial in patients at high risk as assessed by ESRS.²⁰

This study has some limitations. First, the sample size is small and therefore limited the power to show significant associations. Moreover, only 73 of the 102 patients with ABI values had biomarkers determined, although no significant differences were found between both groups.

Secondly, following the study design, the biomarkers were measured only once and blood sampling could not be repeated later during the follow-up period. This fact precluded the assessment of intra-individual variation of the molecules during follow-up. However, determinations in a more stable phase likely provides a better reflection of ongoing low-grade inflammation and impaired fibrinolysis and is therefore a better prognostic marker than values obtained in the acute phase which are often influenced by the extent of cerebral infarct.

Finally, despite variations in measurement technique between studies,¹³ no systematic bias in the classification of ABI rank would have occurred.²² However, the current AHA and TASC II definition used in our study have shown a lower capacity to identify patients at risk of vascular events than a modified definition using the lower of the 2 ankle pressures.¹³

In conclusion, ICAD-stroke patients with severely-lowered ABI and high levels of PAI-1 are at increased risk of stroke recurrence. Furthermore, the combination of biological markers (PAI-1) with clinical scales (ESRS) or ABI, might help in the identification of patients at the highest risk in whom a more intensive therapeutic intervention may be

indicated. This might be potentially useful in the daily clinics evaluation of cerebrovascular recurrence risk.

Acknowledgments and Sources of Funding:

This research was funded with grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and the Spanish stroke research network RENEVAS (RD06/0026/0010). A.M. was the recipient of a research contract from the Foundation Research Institute of the Vall d'Hebron University Hospital in collaboration with "Caixa d'Estalvis i Pensions de Barcelona". P.D. is supported by the Miguel Servet program (CP09/00136) of the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III).

Conflict of interest: None to report

References:

1. Massot A, Pelegri D, Penalba A, Arenillas J, Boada C, Giralt D, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 2011;218:181-7.
2. Weimar C, Goertler M, Röther J, Ringelstein EB, Darius H, Nabavi DG, et al. Predictive value of the Essen Stroke Risk Score and Ankle Brachial Index in acute ischaemic stroke patients from 85 German stroke units. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:1339-43.
3. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348:1329–39.
4. Arenillas JF, Álvarez-Sabín J., Molina CA, Chacón P., Montaner J., Rovira A., et al. 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: 2463-2470.
5. Tanne D, Haim M, Boyko V, Goldbourt U, Reshef T, Matetzky S, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future ischemic stroke: a nested case-control study from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study cohort. *Stroke*. 2002;33:2182-6.
6. Matsumoto K, Fujishima K, Moriuchi A, Saishoji H, Ueki Y. Soluble adhesion molecule E-selectin predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010;59:320-4.
7. Sinkovic A, Pogacar V. Risk stratification in patients with unstable angina and/or non-ST-elevation myocardial infarction by Troponin T and plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1). *Thromb Res*. 2004;114:251-7.
8. Agnelli G, Cimminiello C, Meneghetti G, Urbinati S; Polyvascular Atherothrombosis Observational Survey (PATHOS) Investigators. Low ankle-brachial index predicts an adverse

1-year outcome after acute coronary and cerebrovascular events. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2599-606.

9. Manzano JJ, De Silva DA, Pascual JL, Chang HM, Wong MC, Chen CP. Associations of ankle-brachial index (ABI) with cerebral arterial disease and vascular events following ischemic stroke. *Atherosclerosis.* 2012;223:219-22.

10. Busch MA, Lutz K, Röhl JE, Neuner B, Masuhr F. Low ankle-brachial index predicts cardiovascular risk after acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *Stroke.* 2009;40:3700-5.

11. Sen S, Lynch DR Jr, Kaltsas E, Simmons J, Tan WA, Kim J, et al. Association of asymptomatic peripheral arterial disease with vascular events in patients with stroke or transient ischemic attack. *Stroke.* 2009;40:3472-7.

12. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Chacón P, Fernández-Cadenas I, Ribó M, et al. Progression of symptomatic intracranial large artery atherosclerosis is associated with a proinflammatory state and impaired fibrinolysis. *Stroke.* 2008;39:1456-63.

13. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Lackner K, Savvidis S, Messow CM, et al. AtheroGene Investigators. Different calculations of ankle-brachial index and their impact on cardiovascular risk prediction. *Circulation.* 2008;118:961-7.

14. Pencina MJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Statistical methods for assessment of added usefulness of new biomarkers. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48:1703-11.

15. Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, Polak JF, et al. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:538-45.

16. McDermott MM, Liu K, Criqui MH, Ruth K, Goff D, Saad MF, et al. Ankle-brachial index and subclinical cardiac and carotid disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2005;162:33-41.

17. Tsai AW, Folsom AR, Rosamond WD, Jones DW: Ankle-brachial index and 7-year ischemic stroke incidence: the ARIC study. *Stroke* 2001, 32:1721-4.

18. Alzamora MT, Baena-Díez JM, Sorribes M, Forés R, Toran P, Vicheto M, et al. 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.

19. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation.* 2005 16;112:976-83.

20. Weimar C, Diener HC, Alberts MJ, Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW, et al. REduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry Investigators. The Essen stroke risk score predicts recurrent cardiovascular events: a validation within the REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) registry. *Stroke*. 2009;40:350-4.
21. Shlipak MG, Ix JH, Bibbins-Domingo K, Lin F, Whooley MA. Biomarkers to predict recurrent cardiovascular disease: the Heart and Soul Study. *Am J Med*. 2008;121:50-7.
22. Doobay AV, Anand SS. Sensitivity and specificity of the ankle-brachial index to predict future cardiovascular outcomes: a systematic review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1463-9.

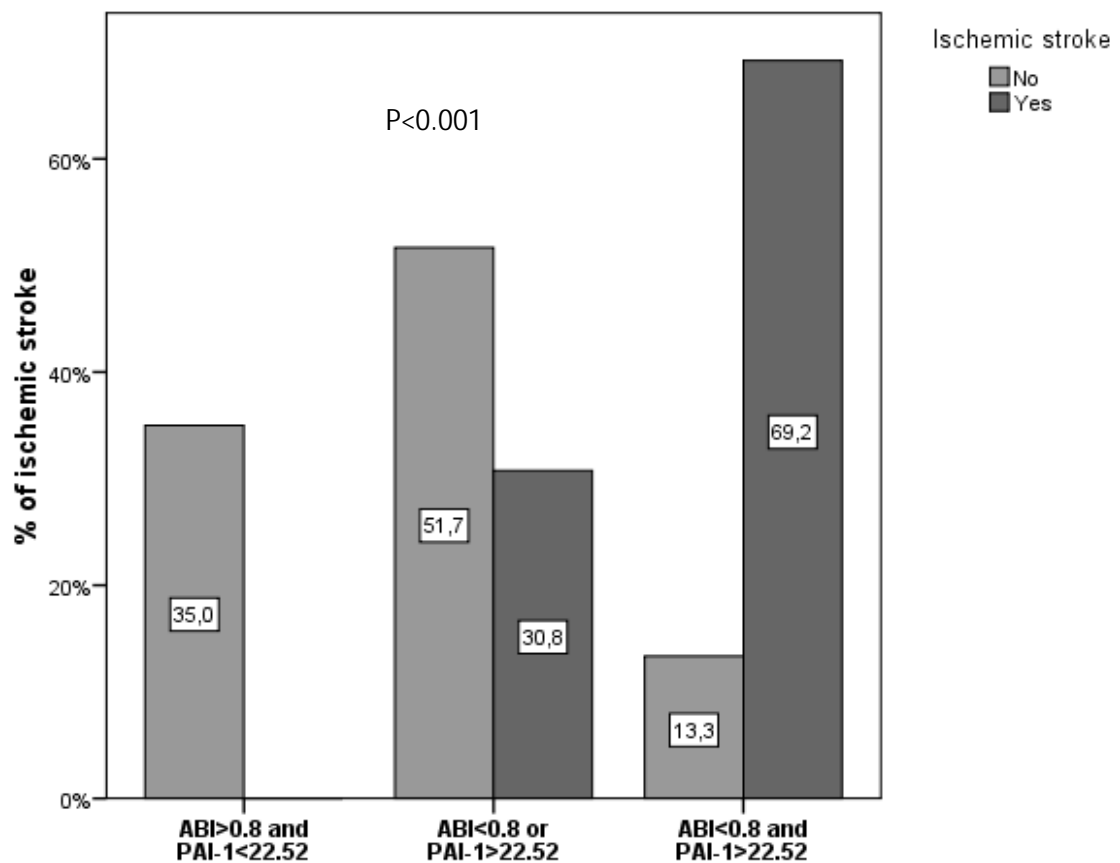
Table 1. Baseline characteristics of the study sample (n=102) and differences between <0.8 and ≥0.8 ABI groups.

Variable	All (n=102)	ABI<0.8 (n=52)	ABI≥0.8 (n=50)	p-value
Age	66.8±8.9	68.1±8.2	65.5±9.5	0.127
Gender (male)	69 (67.6%)	36 (69.2%)	33 (66%)	0.727
Current smoking	42 (41.2%)	23 (44.2%)	19 (38%)	0.523
Hypertension	80 (78.4%)	39 (75%)	41 (82%)	0.390
Diabetes mellitus	57 (55.9%)	35 (67.3%)	22 (44%)	0.018
Hypercholesterolemia	70 (68.6%)	33 (63.5%)	37 (74%)	0.252
Coronary heart disease	15 (14.7%)	9 (17.3%)	6 (12%)	0.449
Intermittent claudication	18 (17.6%)	18 (34.6%)	0 (0%)	<0.001
ESRS	3 (2-4)	3 (3-4)	2.5 (2-3)	<0.001
Qualifying event:				
• Stroke vs. TIA (Stroke)	80 (78.4%)	39 (75%)	41 (82%)	0.390
Qualifying event vascular territory:				0.277
• Anterior	63 (61.8%)	33 (63.5%)	30 (60%)	
• Posterior	29 (28.4%)	12 (23.1%)	17 (34%)	
• Multiple	10 (9.8%)	7 (13.5%)	3 (6%)	
Number of intracranial stenosis	3 (2-4)	3 (2-4)	3 (2-4)	0.09
NIHSS on admission	3 (0-5)	2.5 (0-5.3)	3 (0-4)	0.897
Recurrent vascular event	23 (22.5%)	32.3%	17.2%	0.135
Recurrent cerebrovascular event	16 (15.7%)	28%	6.4%	0.008

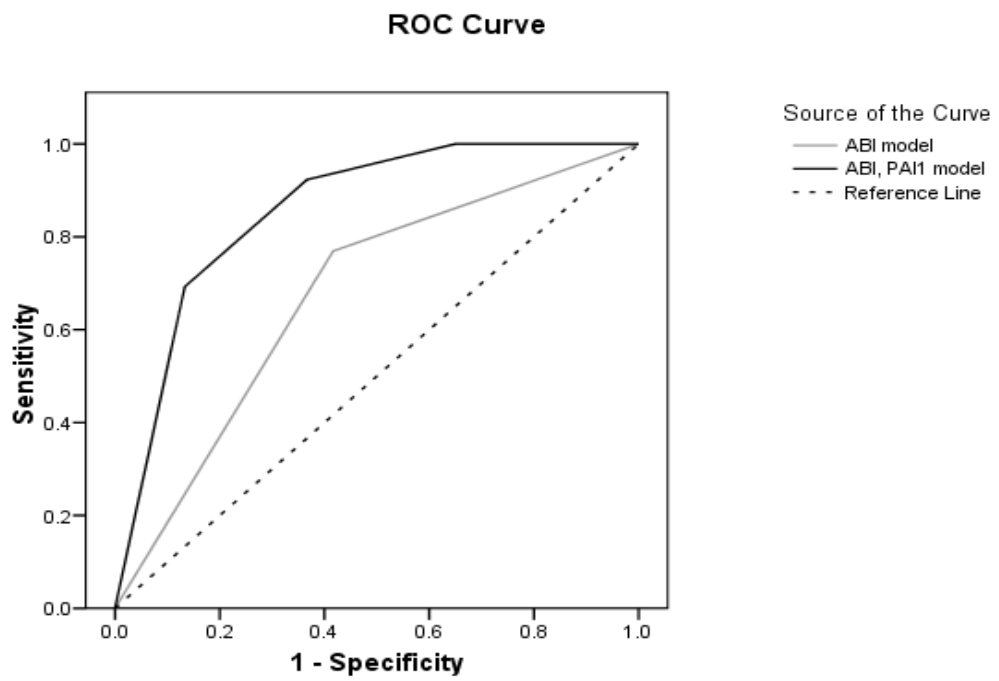
ESRS = Essen Stroke Risk Score. Results are expressed as means ± standard deviation, median [interquartile range] or survival rates as appropriate.

Figure 1. a) Bar graph showing cerebrovascular events according to the different combinations of ABI and PAI-1. b) Areas Under the Curve of ABI and ABI plus PAI-1 models c) Representative graph of Integrated Discriminator Improvement (IDI) gain in the prediction of recurrent cerebrovascular events.

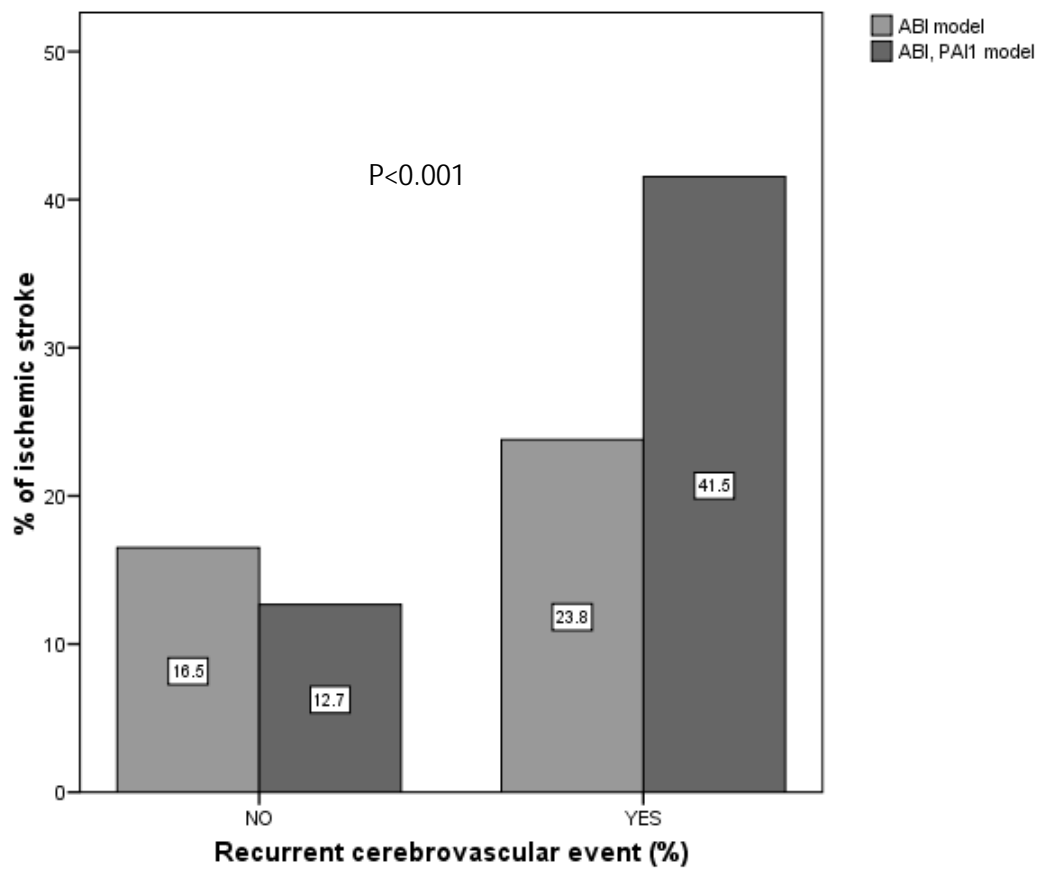
a)



b)



c)



8. BIBLIOGRAFIA

1. Bonita R. Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1992;339:342-344.
2. López Pousa, S., Vilalta, J., Llinás, J. Incidencia de la enfermedad vascular cerebral en España: estudio en un área rural de Girona. *Rev Neurol*. 1995;23:1074-80.
3. Instituto Nacional de Estadística (Spanish Statistical Institute). Defunciones según la Causa de Muerte 1997. <http://www.ine.es/>
4. Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. Part I: incidence and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1484-90.
5. Gorelick PB, Wong KS, Bae HJ, et al. Large artery intracranial occlusive disease: a large worldwide burden but a relatively neglected frontier. *Stroke*. 2008;39:2396-99.
6. Sacco R, Kargman DE, Quiong Gu, et al. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*. 1995;26:14-20.
7. Molina C. Ictus de causa indeterminada y estenosis de las arterias intracraneales. *Neurlogia* 2000;15 [Sul 3]:13-18.
8. Wong KS, Huang YN, Gao S, et al. Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology*. 1998;50:812-13.
9. Huang YN, Gao S, Li SW, et al. Vascular lesions in Chinese patients with transient ischemic attacks. *Neurology*. 1997;48:524-5.
10. Kim JT, Yoo SH, Kwon JH, et al. Subtyping of ischemic stroke based on vascular imaging: analysis of 1167 acute, consecutive patients. *J Clin Neurol*. 2006;2:225-30.
11. Arenillas JF. Intracranial atherosclerosis: current concepts. *Stroke*. 2011;42:S20-3.
12. Mazighi M, Labreuche J, Gongora-Rivera F, et al. Autopsy prevalence of intracranial atherosclerosis in patients with fatal stroke. *Stroke*. 2008;39:1142-47.
13. 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;24:111-15.
14. Wong KS, Ng PW, Tang A, et al. Prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerosis in high-risk patients. *Neurology*. 2007;68:2035-38.
15. Bae HJ, Lee J, Park JM, et al. Risk factors of intracranial cerebral atherosclerosis among asymptomatics. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24:355-60.
16. López-Cancio E, Dorado L, Millán M, et al. The Barcelona-Asymptomatic Intracranial Atherosclerosis (AsIA) study: prevalence and risk factors. *Atherosclerosis*. 2012; 221:221-5.
17. Arenillas Lara JF, Atherosclerosis intracraneal de gran vaso: progresión y recurrencia clínica. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona. 2003.
18. Samuels OB, Joseph GJ, Lynn MJ, Smith HA, Chimowitz MI. A standardized method for measuring intracranial arterial stenosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21:643-6.
19. Chen XY, Wong KS, Lam WW, et al. 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.

20. Meyers PM, Schumacher HC, Gray WA, et al. Intravascular ultrasound of symptomatic intracranial stenosis demonstrates atherosclerotic plaque with intraplaque hemorrhage: a case report. *J Neuroimaging*. 2009;19:266–70.
21. Turan TN, Bonilha L, Morgan PS, et al. Intraplaque hemorrhage in symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *J Neuroimaging*. 2011;21:e159-61.
22. Klein IF, Lavallée PC, Mazighi M, et al. Basilar artery atherosclerotic plaques in paramedian and lacunar pontine infarctions: a high-resolution MRI study. *Stroke*. 2010;41:1405–09.
23. Lindegaard KF, Bakke SJ, Aaslid R, et al. Doppler diagnosis of intracranial artery occlusive disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986;49:510-8.
24. Lin SK, Ryu SJ, Chang YJ, et al. Clinical relevance of musical murmurs in color-coded carotid and transcranial duplex sonographies. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27:1493-7
25. Ley-Pozo J, Ringelstein EB. Noninvasive detection of occlusive disease of the carotid siphon and middle cerebral artery. *Ann Neurol*. 1990;28:640-7.
26. Wong KS, Li H, Lam WW, et al. Progression of middle cerebral artery occlusive disease and its relationship with further vascular events after stroke. *Stroke*. 2002;33:532-6.
27. Aaslid R, Nornes H. Musical murmurs in human cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1984;60:32-6.
28. Feldmann E., Wilterdink J. L., Kosinski A. et al. The stroke outcomes and neuroimaging of intracranial atherosclerosis (SONIA) trial. *Neurology*. 2007;68:2099–6.
29. Chimowitz M. I., Lynn M. J., Derdeyn C. P. et al. Stenting versus aggressive medical therapy for intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med*. 2011;365, 993-1003.
30. Valaikiene J, Schuierer G, Ziemus B, et al. Transcranial color-coded duplex sonography for detection of distal internal carotid artery stenosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29:347-53.
31. Röther J, Schwartz A, Wentz KU, et al. Middle cerebral artery stenoses: assessment by magnetic resonance angiography and transcranial Doppler ultrasound. *Cerebrovasc Dis*. 1994;4:273-79.
32. Baumgarther RW, Mattle HP, Schroth G. Assessment of $\geq 50\%$ or $< 50\%$ intracranial stenoses by transcranial color-coded Duplex sonography. *Stroke*. 1999;30:87-92.
33. Felberg RA, Christou I, Demchuck AM, et al. Screening for intracranial stenosis with transcranial Doppler: the accuracy of mean flow velocity thresholds. *J Neuroimaging*. 2002;12:9-14.
34. Zhao L., Barlinn K., Sharma V. K. et al. Velocity criteria for intracranial stenosis revisited n international multicenter study of transcranial Doppler and digital subtraction angiography. *Stroke*. 2011;42: 3429–34.
35. Grolimund P, Seiler RW. Age dependence of the flow velocity in the basal cerebral arteries: a transcranial Doppler ultrasound study. *Ultrasound Med Biol*. 1988;14:171-8.
36. Rorick MB, Nichols FT, Adams RJ. Transcranial Doppler correlation with angiography in detection of intracranial stenosis. *Stroke*. 1994;25:1931-4.
37. Mull M, Aulich A, Hennerici M. Transcranial Doppler ultrasonography versus arteriography for assessment of the vertebrobasilar circulation. *J Clin Ultrasound*. 1990;18:539-49.

38. Zunker P, Wilms H, Brossmann J, et al. Echo contrast-enhanced transcranial ultrasound: frequency of use, diagnostic benefit, and validity of results compared with MRA. *Stroke*. 2002;33:2600-3.
39. Hansberg T, Wong KS, Droste DW, et al. Effects of the ultrasound contrast-enhancing agent Levovist on the detection of intracranial arteries and stenoses in chinese by transcranial Doppler ultrasound. *Cerebrovasc Dis*. 2002;14:105-8.
40. Suwanwela NC, Phanthumchinda K, Suwanwela N. Transcranial doppler sonography and CT angiography in patients with atherothrombotic middle cerebral artery stroke. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23:1352-5.
41. Kimura K, Yasaka M, Wada K, et al. Diagnosis of middle cerebral artery stenosis by transcranial color-coded real-time sonography. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998; 19:1893-6.
42. Liu HM, Tu YK, Yip PK, et al. Evaluation of intracranial and extracranial carotid stenooclusive diseases in Taiwan Chinese patients with MR angiography: preliminary experience. *Stroke*. 1996;27:650-3.
43. Uehara T, Tabuchi M, Hayashi T, et al. Asymptomatic occlusive lesions of carotid and intracranial arteries in Japanese patients with ischemic heart disease: evaluation by brain magnetic resonance angiography. *Stroke*. 1996;27:393-7.
44. Nederkoorn PJ, van der Graaf Y, Eikelboom BC, et al. Time-of-flight MR angiography of carotid artery stenosis: does a flow void represent severe stenosis? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23:1779-84.
45. Fürst G, Hofer M, Sitzler M, et al. Factors influencing flow-induced signal loss in MR angiography: an in vitro study. *J Comput Assist Tomogr*. 1995;19:692-99.
46. Fürst G, Hofer M, Steinmetz H, et al. Intracranial stenooclusive disease: MR angiography with magnetization transfer and variable flip angle. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996;17:1749-57.
47. Townsend TC, Saloner D, Pan XM, et al. Contrast material-enhanced MRA overestimates severity of carotid stenosis, compared with 3D time-of-flight MRA. *J Vasc Surg*. 2003;38:36-40.
48. Niizuma K, Shimizu H, Takada S, et al. Middle cerebral artery plaque imaging using 3-Tesla high-resolution MRI. *J Clin Neurosci*. 2008;15:1137-41.
49. Ibarra de Grassa B, Romero-Vidal FJ, Alarcón-Alcaraz MM, et al. Estudio de la artera carótida interna hipoplásica mediante tomografía computarizada helicoidal multicorte. A propósito de dos casos. *Rev Neurol*. 2002;35:832-7.
50. Klingebiel R, Busch M, Bohner G, et al. Multi-slice CT angiography in the evaluation of patients with acute cerebrovascular disease--a promising new diagnostic tool. *J Neurol*. 2002;249:43-9.
51. Hirai T, Korogi Y, Ono K, et al. 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;23:93-1.
52. Bash S, Villablanca JP, Jahan R, et al. Intracranial vascular stenosis and occlusive disease: evaluation with CT angiography, MR angiography, and digital subtraction angiography. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005;26:1012-21.

53. Skutta B, Fürst G, Eilers J, et al. Intracranial stenooclusive disease: double-detector helical CT angiography versus digital subtraction angiography. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999;20:791-9
54. Gorelick PB, Caplan LR, Hier DB, et al. Racial differences in the distribution of posterior circulation occlusive disease. *Stroke.* 1985;16:785-90.
55. Caplan LR, Gorelick PB, Hier DB. Race, sex and occlusive cerebrovascular disease: a review. *Stroke.* 1986;17:648-55.
56. Inzitari D, Hachinski VC, Taylor DW, et al. Racial differences in the anterior circulation in cerebrovascular disease. How much can be explained by risk factors? *Arch Neurol.* 1990;47:1080-4.
57. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988;19:1083-92.
58. Wityk RJ, Lehman D, Klag M, et al. Race and sex differences in the distribution of cerebral atherosclerosis. *Stroke.* 1996;27:1974-80.
59. Nishimura K, McHenry LC, Toole JF. Cerebral angiographic and clinical differences in carotid system transient ischemic attacks between American Caucasian and Japanese patients. *Stroke.* 1984; 15:56-59.
60. Feldmann E, Daneault N, Kwan E, et al. Chinese-white differences in the distribution of occlusive cerebrovascular disease. *Neurology.* 1990;40:1541-5.
61. Gorelick PB, Caplan LR, Hier DB, et al. Racial differences in the distribution of anterior circulation occlusive disease. *Neurology.* 1984;34:54-9.
62. Qureshi AI, Safdar K, Patel M, et al. Stroke in young black patients. Risk factors, subtypes, and prognosis. *Stroke.* 1995;26:1995-8.
63. Mendes I, Baptista P, Soares F, et al. Diabetes mellitus and intracranial stenosis. *Rev Neurol.* 1999. 1-15;28:1030-3.
64. Bang OY, Lee PH, Yoon SR, et al. Inflammatory markers, rather than conventional risk factors, are different between carotid and MCA atherosclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005; 76:1128-34.
65. Rincon F, Sacco RL, Kranwinkel G, et al. Incidence and risk factors of intracranial atherosclerotic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *Cerebrovasc Dis.* 2009;28:65-71.
66. Park JH, Kwon HM, Roh JK. Metabolic syndrome is more associated with intracranial atherosclerosis than extracranial atherosclerosis. *Eur J Neurol.* 2007;14:379-86.
67. Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Vila-Caballer M, et al. Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2187-94.
68. 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;32:2472-79.
69. Bang OY, Saver JL, Liebeskind DS, et al. Impact of metabolic syndrome on distribution of cervicocephalic atherosclerosis: data from a diverse race-ethnic group. *J Neurol Sci.* 2009;284: 40-45.

70. Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, et al, for the Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Trial Investigators. Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med*. 2005;352:1305–16.
71. Chimowitz MI, Kokkinos J, Strong J, et al. The Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease Study. *Neurology*. 1995;45:1488–93.
72. Famakin BM, Chimowitz MI, Lynn MJ, et al, for the WASID Trial Investigators. Causes and severity of ischemic stroke in patients with symptomatic intracranial arterial stenosis. *Stroke*. 2009;40:1999–2003.
73. Arenillas JF, Molina CA, Montaner J, et al. Progression and clinical recurrence of symptomatic middle cerebral artery stenosis: a long-term follow-up transcranial Doppler ultrasound study. *Stroke*. 2001;32:2898-904.
74. Kasner SE, Chimowitz MI, Lynn MJ, et al. Predictors of ischemic stroke in the territory of a symptomatic intracranial arterial stenosis. *Circulation*. 2006;113:555-63.
75. Akins PT, Pilgram TK, Cross DT 3rd, et al. Natural history of stenosis from intracranial atherosclerosis by serial angiography. *Stroke*. 1998;29:433-38.
76. Marzewski DJ, Furlan AJ, St Louis P, et al. Intracranial internal carotid artery stenosis: longterm prognosis. *Stroke*. 1982;13:821-4.
77. Craig DR, Meguro K, Watridge C, et al. Intracranial internal carotid artery stenosis. *Stroke*. 1982;13:825-8.
78. Wechsler LR, Kistler JP, Davis KR, et al. The prognosis of carotid siphon stenosis. *Stroke*. 1986;17:714-8.
79. Bogousslavsky J, Barnett HJ, Fox AJ, et al. Atherosclerotic disease of the middle cerebral artery. *Stroke*. 1986;17:1112-20.
80. The Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID) Study Group. Prognosis of patients with symptomatic vertebral or basilar artery stenosis. *Stroke*. 1998;29:1389-92.
81. Chaturvedi S, Turan TN, Lynn MJ, et al, for the WASID Study Group. Risk factor status and vascular events in patients with symptomatic intracranial stenosis. *Neurology*. 2007;69:2063–68.
82. Turan TN, Cotsonis G, Lynn MJ, et al, for the Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID) Trial Investigators. Relationship between blood pressure and stroke recurrence in patients with intracranial arterial stenosis. *Circulation*. 2007;115:2969-75.
83. Amarenco P, Goldstein LB, Szarek M, et al, for the SPARCL Investigators. Effects of intense low-density lipoprotein cholesterol reduction in patients with stroke or transient ischemic attack: the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Trial. *Stroke*. 2007;38:3198–3204.
84. Mok VC, Lam WW, Chen XY, et al. Statins for asymptomatic middle cerebral artery stenosis: the Regression of Cerebral Artery Stenosis Study. *Cerebrovasc Dis*. 2009;28:18–25.
85. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al, for the Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001; 345:494–502.

86. Bhatt DL, Marso SP, Hirsch AT, et al. Amplified benefit of clopidogrel versus aspirin in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2002;90:625-8.
87. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events (CAPRIE). *Lancet.* 1996;348:1329-39.
88. Diener HC, Ringleb PA, Savi P. Clopidogrel for the secondary prevention of stroke. *Exp Opin Pharmacother.* 2005;6:755-64.
89. Kwon SU, Cho YJ, Koo JS, et al. Cilostazol prevents the progression of the symptomatic intracranial arterial stenosis: the multicenter double-blind placebo-controlled trial of cilostazol in symptomatic intracranial arterial stenosis. *Stroke.* 2005;36:782-86.
90. Wong KS, Chen C, Fu J, et al, for the 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;9:489-97.
91. Turan TN, Derdeyn CP, Fiorella D, et al. Treatment of atherosclerotic intracranial arterial stenosis. *Stroke.* 2009;40:2257-61.
92. Gupta R, Schumacher HC, Mangla S, et al. Urgent endovascular revascularization revascularization for symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis. *Neurology.* 2003;61:1729-35.
93. Marks MP, Marcellus ML, Do HM, et al. Intracranial angioplasty without stenting for symptomatic atherosclerotic stenosis: long-term follow-up. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26:525-30.
94. Yoon W, Seo JJ, Cho KH, et al. Symptomatic middle cerebral artery stenosis treated with intracranial angioplasty: experience in 32 patients. *Radiology.* 2005;237:620-26.
95. Leung TW, Yu SC, Lam WW, et al. Would self-expanding stent occlude middle cerebral artery perforators? *Stroke.* 2009;40:1910-12.
96. Siddiq F, Vazquez G, Memon MZ, et al. Comparison of primary angioplasty with stent placement for treating symptomatic intracranial atherosclerotic diseases: a multicenter study. *Stroke.* 2008;39:2505-10.
97. Suh DC, Kim JK, Choi JW, et al. Intracranial stenting of severe symptomatic intracranial stenosis: results of 100 consecutive patients. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29:781-85.
98. Gröschel K, Schnaudigel S, Pilgram SM, et al. A systematic review on outcome after stenting for intracranial atherosclerosis. *Stroke.* 2009;40:e340-e347.
99. Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, et al. AHA guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke: 2002 update. *Circulation.* 2002;106:388-91.
100. Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, et al. Coronary risk estimation in Spain using a calibrated Framingham function. *Rev Esp Cardiol.* 2003;56:253-61.
101. Barroso LC, Muro EC, Herrera ND, et al. Performance of the Framingham and SCORE cardiovascular risk prediction functions in a non-diabetic population of a Spanish health care centre: a validation study. *Scand J Prim Health Care.* 2010;28:242-8
102. Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, et al. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke.* 1991;22:312-8.

103. Viscoli CM, Brass LM, Kernan WN, et al. A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2001;345:1243-49.
104. Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, et al. The Stroke Prognosis Instrument II (SPI-II): a clinical prediction instrument for patients with transient ischemia and nondisabling ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:456-62.
105. Hankey GJ, Slattery JM, Warlow CP. Can the long term outcome of individual patients with transient ischaemic attacks be predicted accurately? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56:752-59.
106. Kernan WN, Horwitz RI, Brass LM, et al. A prognostic system for transient ischemia or minor stroke. *Ann Intern Med*. 1991;114:552-57.
107. Hankey GJ, Slattery JM, Warlow CP. Transient ischaemic attacks: which patients are at high (and low) risk of serious vascular events? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992; 55:640-52.
108. van Wijk I, Kappelle LJ, van Gijn J, et al. Long-term survival and vascular event risk after transient ischaemic attack or minor ischaemic stroke: a cohort study. *Lancet*. 2005;365:2098-104.
109. Weimar C, Goertler M, Rother J, et al. Systemic risk score evaluation in ischemic stroke patients (SCALA): a prospective cross sectional study in 85 German stroke units. *J Neurol*. 2007;254:1562-68.
110. Weimar C, Goertler M, Rother J, et al. Predictive value of the Essen Stroke Risk Score and ankle brachial index in acute ischemic stroke patients from 85 German stroke units. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:1339-43.
111. Weimar C, Diener HC, Alberts MJ, et al. The Essen Stroke Risk Score predicts recurrent cardiovascular events: a validation within the REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) registry. *Stroke*. 2009;40:350-54.
112. Diener HC. Modified-release dipyridamole combined with aspirin for secondary stroke prevention. *Aging Health*. 2005;1:19-26.
113. Weimar C, Benemann J, Michalski D, et al; German Stroke Study Collaboration. Prediction of recurrent stroke and vascular death in patients with transient ischemic attack or nondisabling stroke: a prospective comparison of validated prognostic scores. *Stroke*. 2010;41:487-93.
114. Ouriel K, Zarins CK. Doppler ankle pressure: an evaluation of three methods of expression. *Arch Surg*. 1982;117:1297-300.
115. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al, TASC II Working Group. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45:S5-67.
116. Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, et al. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:538-45.
117. Zheng ZJ, Sharrett AR, Chambless LE, et al. Associations of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 1997; 131:115-25.

118. Sen S, Lynch Jr DR, Kaltsas E, et al. Association of asymptomatic peripheral arterial disease with vascular events in patients with stroke or transient ischemic attack. *Stroke*. 2009;40:3472-7.
119. Busch MA, Lutz K, Röhl JE, et al. Low ankle-brachial index predicts cardiovascular risk after acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *Stroke*. 2009;40:3700-5.
120. Mostaza JM, González-Juanatey JR, Castillo J, et al. Prevalence of carotid stenosis and silent myocardial ischemia in asymptomatic subjects with a low ankle-brachial index. *J Vasc Surg*. 2009;49:104-8.
121. Manzano JJ, De Silva DA, Pascual JL, et al. Associations of ankle-brachial index (ABI) with cerebral arterial disease and vascular events following ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2012;223:219-22.
122. Virchow R, Reinhardt B. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie and für Klinische Medicin*. Berlin: Bruck und Verlag von G. Reimer; 1847.
123. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
124. Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, et al. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum Pathol*. 1987;18:375-80.
125. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. 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;89:2462-78.
126. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990;344:254-57.
127. Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, et al. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res*. 1998;82:532-39.
128. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999;85:199-207.
129. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, et al. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;94:885-91.
130. Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, et al. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest*. 1997;99:737-44.
131. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1859-67.
132. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*. 1997;81:448-54.
133. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145:33-43.

134. Tenaglia AN, Buda AJ, Wilkins RG, et al. Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 1997;79:742-47.
135. Simon AD, Yazdani S, Wang W, et al. Inflammatory cytokine profiles in stable versus unstable angina. *J Thromb Thrombolysis.* 2000; 9:217-22.
136. Jander S, Sitzer M, Schumann R, et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke.* 1998; 29: 1625-30.
137. DeGraba TJ. Vascular cell adhesion molecules-1 has been shown to be highly expressed in atherosclerotic lesion. *Neurology.* 1997;49:S15-S19.
138. DeGraba TJ, Siren AL, Penix L, et al. Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke.* 1998;29:1405-10.
139. Elkind MS. Inflammation, atherosclerosis, and stroke. *Neurologist.* 2006;12:140-8.
140. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89-95.
141. Foerch C, Montaner J, Furie KL, et al. Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology.* 2009;4;73:393-9.
142. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke.* 2009;40:e380-9.
143. Verma S, Szmitko PE, Yeh ETH. C-reactive protein: structure affects function. *Circulation.* 2004;109:1914-17.
144. Khreiss T, Jozef L, Potempa LA, et al. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation.* 2004;109:2016-22.
145. Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation.* 2001;104:63-7.
146. Van Der Meer IM, De Maat MP, Hak AE, et al. Hofman A, Witteman JC. C-reactive protein predicts progression of atherosclerosis measured at various sites in the arterial tree: the Rotterdam Study. *Stroke.* 2002;33:2750-5.
147. Zairis MN, Manousakis SJ, Stefanidis AS, et al. C-reactive protein and rapidly progressive coronary artery disease--is there any relation? *Clin Cardiol.* 2003;26:85-90.
148. Sano T, Tanaka A, Namba M, et al. C-reactive protein and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2003;108:282-85.
149. Cao JJ, Thach C, Manolio TA, et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Circulation.* 2003;108:166-170.
150. van der Meer IM, de Maat MP, Bots ML, et al. Inflammatory mediators and cell adhesion molecules as indicators of severity of atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:838-42.

151. Wang TJ, Nam BH, Wilson PW, et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1662-7.
152. Blackburn R, Giral P, Bruckert E, et al. Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1962-8.
153. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336:973-79.
154. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation.* 1998;97:2007-11.
155. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-43.
156. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-65.
157. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003;107:499-11.
158. Ford ES, Giles WH. Serum C-reactive protein and self-reported stroke: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1052-56.
159. Gusssekloo J, Schaap MC, Frölich M, et al. C-reactive protein is a strong but nonspecific risk factor of fatal stroke in elderly persons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1047-51.
160. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack. *Stroke.* 2001;32:2575-2579.
161. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, et al. C-reactive protein and the future risk of thromboembolic stroke in healthy men. *Circulation.* 2003;107:2016-20.
162. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, et al. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke.* 1999;30:981-985.
163. Di Napoli M, Papa F, Bocola V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke.* 2001;32:133-38.
164. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, et al. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke.* 2003;34:2463-70.
165. Pearson TA, Mensah GA, Hong Y, et al. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: overview. *Circulation.* 2004;110: e543-44.
166. Wolf PA, Clagett GP, Easton JD, et al. Preventing ischemic stroke in patients with prior stroke and transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke.* 1999;30:1991-94.

167. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al; the JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359:2195-207.
168. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000;343:1586-3.
169. Weinblatt ME, Kaplan H, Germain BF, et al. Low-dose methotrexate compared with auranofin in adult rheumatoid arthritis. A thirty-six-week, double-blind trial. *Arthritis Rheum*. 1990;33:330-38.
170. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, et al. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: A prospective study. *Lancet*. 2002;359: 1173-77.
171. Lakoski SG, Cushman M, Blumenthal RS, et al. Implications of C-reactive protein or coronary artery calcium score as an adjunct to global risk assessment for primary prevention of CHD. *Atherosclerosis*. 2007;193: 401-407.
172. Fox ER, Benjamin EJ, Sarpong DF, et al. Epidemiology, heritability, and genetic linkage of c-reactive protein in African Americans (from the Jackson Heart Study). *Am J Cardiol*. 2008;102: 835–41.
173. Shah T, Newcombe P, Smeeth L, et al. Ancestry as a determinant of mean population C-reactive protein values: implications for cardiovascular risk prediction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:436-44.
174. Arima H, Kubo M, Yonemoto K, Doi Y, et al. High-sensitivity C-reactive protein and coronary heart disease in a general population of Japanese: the Hisayama Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1385-1391.
175. Iso H, Cui R, Date C, Kikuchi S, et al. C-reactive protein levels and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese: the Journal of the American College of Cardiology Study. *Atherosclerosis*. 2009;207: 291–97.
176. Takahashi W, Ohnuki T, Ohnuki Y, et al. The role of high-sensitivity C-reactive protein in asymptomatic intra- and extracranial large artery diseases. *Cerebrovasc Dis*. 2008;26:549-55.
177. de Maat MP, Kluft C. Determinants of C-reactive protein concentration in blood. *Ital Heart J*. 2001; 2:189–95.
178. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH, et al. Distribution and correlates of C-reactive protein concentrations among adult US women. *Clin Chem*. 2004;50:574–81.
179. MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, et al. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem*. 2004;50:130-4.
180. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*. 2001;154:681-9.
181. Miller DT, Zee RY, Suk Danik J, et al. Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet*. 2005;69:623-38.
182. Lange LA, Carlson CS, Hindorff LA, et al. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA*. 2006;296:2703-11.
183. Cappuccio FP, Cook DG, Atkinson RW, et al. Prevalence, detection, and management of cardiovascular risk factors in different ethnic groups in south London. *Heart*. 1997;78:555-63.

184. Cappuccio FP, Cook DG, Atkinson RW, et al. The Wandsworth Heart and Stroke Study: a population-based survey of cardiovascular risk factors in different ethnic groups: methods and baseline findings. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 1998;8:371–85.
185. Lakoski SG, Herrington DM, Siscovick DM, et al. C-reactive protein concentration and incident hypertension in young adults: the CARDIA Study. *Arch Intern Med.* 2006;166:345–49.
186. Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, et al. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1398-404.
187. Kovacs A, Tornvall P, Nilsson R, et al. Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13768-73.
188. Barinas-Mitchell E, Cushman M, Meilahn EN, et al. Serum levels of C-reactive protein are associated with obesity, weight gain, and hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* 2001;153:1094-101.
189. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, et al. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem.* 1990; 265:9682–7.
190. Häkkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2909–17.
191. Lepran I, Lefler AM: Ischemia aggravating effects of platelet-activating factor in acute myocardial ischemia. *Basic Res Cardiol.* 1985, 80:135–41.
192. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem.* 1997, 272:17895-98.
193. Watson AD, Navab M, Hama SY, et al.: Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995,95:774-82.
194. Bochkov VN, Leitinger N. Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products. *J Mol Med.* 2003; 81: 613-26.
195. Birukov KG, Bochkov VN, Birukova AA. Epoxycyclopentenone-containing oxidized phospholipids restore endothelial barrier function via Cdc42 and Rac. *Cir Res.* 2004; 95: 892-901.
196. Shi Y, Zhang P, Zhang L, et al. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses. *Atherosclerosis.* 2007;191:54–62.
197. Quinn M, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:2805–9.
198. Corson MA, Jones PH, Davidson MH. Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker. *Am J Cardiol.* 2008;101:41F–50F.
199. Wolfert RL, Kim NW, Selby RG, et al. Biological variability and specificity of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2), a novel marker of cardiovascular risk. *Circulation.* 2004;110(Suppl 3):309.

200. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2005;111:570–75.
201. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk of incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch Intern Med*. 2005; 165: 2479-84.
202. Brilakis ES, Khera A, McGuire DK, et al. Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis*. 2008;199:110–5.
203. Persson M, Nilsson JA, Nelson JJ, et al. The epidemiology of Lp-PLA(2): distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort. *Atherosclerosis*. 2007; 190:388–96.
204. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2004; 109:837-42.
205. Miyaura S, Maki N, Byrd W, et al. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids*. 1991;26:1015–20.
206. Tsimikas S, Willeit J, Knoflach M, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J*. 2009;30:107-15.
207. Packard CJ, O'Reilly DSJ, Caslake MJ, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2000;343:1148-55.
208. Brilakis ES, McConnell JP, Lennon RJ, et al. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J*. 2005;26:137-44.
209. Koenig W, Twardella D, Brenner H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1586-93.
210. Lanman RB, Wolfert RL, Fleming JK, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2: review and recommendation of a clinical cut point for adults. *Prev Cardiol*. 2006;9:138-3.
211. Heart Disease and Stroke Statistics—2006 Update, American Heart Association.
212. Elkind MS, Tai W, Coates K, et al. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med*. 2006; 166: 2073-80.
213. Blake GJ, Dada N, Fox JC, et al. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1302-6.
214. Campo S, Sardo MA, Bitto A et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is not associated with carotid intima-media thickness in hypercholesterolemic Sicilian individuals. *Clin Chem*. 2004; 50:2077-82.

215. Persson M, Berglund G, Nelson JJ, et al. Lp-PLA2 activity and mass are associated with increased incidence of ischemic stroke: a population-based cohort study from Malmö, Sweden. *Atherosclerosis*. 2008;200:191-8.
216. Elkind MS, Tai W, Coates K, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of recurrent stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27:42-50.
217. Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson A, Gao P et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet*. 2010;375:1536-44.
218. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol*. 2008;101:51F-7F.
219. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990; 34:425-34.
220. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989;243:1160-65.
221. Johnson Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, et al. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques: co-expression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol*. 1994;144:952-61.
222. Endres M, Laufs U, Merz H, et al. Focal expression of intercellular adhesion molecule-1 in the human carotid bifurcation. *Stroke*. 1997;28:77-82.
223. Frijns CJM, Kappelle LJ, van Gijn J, et al. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1997;28:2214-18.
224. Hwang S-J, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96:4219-25.
225. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, et al. Plasma concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88-92.
226. Fassbender K, Bertsch T, Mielke O, et al. Adhesion molecules in cerebrovascular diseases. Evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large- and small-vessel disease. *Stroke*. 1999;30:1647-50.
227. Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, et al. Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1998;101:1064-1075.
228. Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6911-14.
229. Wimmer MLJ, Sandmann-Strupp R, Saikku P, et al. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke*. 1996;27:2207-210.
230. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1517-20.

231. Nie Q, Fan J, Haraoka S, et al. Inhibition of mononuclear cell recruitment in aortic intima by treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in hypercholesterolemic rats: implications of the ICAM-1 and LFA-1 pathway in atherogenesis. *Lab Invest.* 1997;77:469–82.
232. 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.
233. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1792-801.
234. Gils A, Declerck PJ. The structural basis for the pathophysiological relevance of PAI-I in cardiovascular diseases and the development of potential PAI-I inhibitors. *Thromb Haemost.* 2004;91:425-37.
235. Dupont DM, Madsen JB, Kristensen T, et al. Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1. *Front Biosci.* 2009;14:1337–61.
236. Dimova EY, Kietzmann T. Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver. *Thromb Haemost.* 2008;100:992–1006.
237. Nagai N, Van Hoef B, Lijnen HR. Plasminogen activator inhibitor-1 contributes to the deleterious effect of obesity on the outcome of thrombotic ischemic stroke in mice. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1726–31.
238. Lip GY, Blann AD. Does hypertension confer a prothrombotic state? Virchow's triad revisited. *Circulation.* 2000;101:218–20.
239. Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18: 240–245.
240. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med.* 2007; 262:157-2.
241. Vaughan DE, Rouleau JL, Pfeffer MA. Role of the fibrinolytic system in preventing myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1995;16 Suppl K:31-6.
242. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, et al. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation.* 1996;94:2057-63.
243. Collet JP, Montalescot G, Vicaute E, et al. Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. *Circulation.* 2003;108:391-4.
244. Ribo M, Montaner J, Molina CA, et al. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2004;91:1146-51.
245. Fay WP, Garg N, Sunkar M. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1231–7.
246. Schneider DJ, Hayes M, Wadsworth M, et al. Attenuation of neointimal vascular smooth muscle cellularity in atheroma by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *J Histochem Cytochem.* 2004;52:1091–99.

247. Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, et al. Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. *Blood*. 2002;99:2077-83.
248. Dunn EJ, Grant PJ. Type 2 diabetes: an atherothrombotic syndrome. *Curr Mol Med*. 2005;5:323-32.
249. Asahara T, Murshara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964.
250. Liman TG, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 33: 492-99.
251. Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux J, et al. Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts. *Stroke*. 2008;39:2158-65.
252. Tura O, Barclay GR, Roddie H, et al. Absence of a relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources. *J Transl Med*. 2007;5:37.
253. Navarro Sobrino M, Influència de les cèl.lules endotelials progenitories sobre la modulació espacial i temporal de l'angiogènesis i la vasculogènesis després de l'ictus isquèmic humà. Tesi doctoral. 2010.
254. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, et al. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis*. 2008;197:496-503.
255. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, et al. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 454-71.
256. Navarro M, Rosell A, Hernández-Guillamón M, Cuadrado E, et al. The therapeutic potential of endothelial progenitor cells in ischaemic stroke. *Rev Neurol*. 2007;45:556-2
257. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 288-93.
258. Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005;112: 1618-27.
259. Ingram D, Caplice N, Yoder M. Unresolved questions, changing definition, and a novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005; 106: 1525-31.
260. Yoder M, Mead L, Prater D, et al. Re-defining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cells principals. *Blood*. 2006;419:439-73.
261. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:318-22.
262. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002; 109: 625-7.
263. Zheng H, Fu G, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:274-80.

264. Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:484-92.
265. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221–228.
266. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18: 3964–3972.
267. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, et al. VW Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol.* 1996;132:1177-8.
268. Shimamura M, Sato N, Oshima K, et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation.* 2004;109:424-31.
269. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7:575-583.
270. Brizzi MF, Battaglia E, Montrucchio G, et al. Thrombopoietin stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis by a platelet-activating factor-dependent mechanism. *Circ Res.* 1999;84:785-796.
271. Shyu WC, Lin SZ, Yen PS, et al. Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324:834-49.
272. Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, et al. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvasc Res.* 2010; 80: 317–23.
273. Akita T, Murohara T, Ikeda H, et al. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 2003; 83:65-73.
274. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One.* 2009;4:e5643.
275. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003;107:1164-9.
276. Sadohara T, Sugahara K, Urashima Y, et al. Keratinocyte growth factor prevents ischemia-induced delayed neuronal death in the hippocampal CA1 field of the gerbil brain. *Neuroreport.* 2001;12:71-76.
277. He T, Smith LA, Harrington S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke.* 2004; 35: 2378-84.
278. Gulati R, Jevremovi D, Witt T, et al. Modulation of the vascular response to injury by autologous blood-derived outgrowth endothelial cells. *Am J Physiol Heart Cir Physiol.* 2004; 287: 512-7.

279. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003; 348:593-600.
280. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005; 353:999-1007.
281. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005; 111: 2981–87.
282. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, et al. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*. 2006;187:423-2.
283. Delva P, Degan M, Vallerio P, et al. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2007; 25: 127-32.
284. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, et al. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:1305-13.
285. Chu K, Jung KH, Lee ST, et al. Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke. *Stroke*. 2008; 39:1441-47.
286. Werner N, Nickenig G. Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease. *Ann Med*. 2007;39: 82-90.
287. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*. 2004;109:2972-75.
288. Taguchi A, Nakagomi N, Matsuyama T, et al. Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29:34-38.
289. Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al: Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39:69–74.
290. Cesari F, Nencini P, Nesi M, et al. Bone marrow-derived progenitor cells in the early phase of ischemic stroke: relation with stroke severity and discharge outcome. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29:1983-90.
291. Pescini F, Cesari F, Giusti B, et al. Bone marrow-derived progenitor cells in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke*. 2010; 41: 218–23.
292. Rafat N, Beck GC, Pena-Tapia PG, et al. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with moyamoya disease. *Stroke*. 2009; 40: 432–38.
293. Ghani U, Shuaib A, Salam A, et al. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke*. 2005;36:151-53.
294. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke*. 2007;38:2759-64.
295. Jickling G, Salam A, Mohammad A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and age-related white matter changes. *Stroke*. 2009; 40: 3191–96.
296. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004; 109: 220-6.

297. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res.* 2010;79:184-92.
298. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1567-72.
299. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 2004;8:498-508.
300. Antonio N, Fernandes R, Rodriguez-Losada N, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative effect of several cardiovascular drugs. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010; 66: 219–230.
301. Miller-Kasprzak E, Jagodziński PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55:247-59.
302. Martin-Rendon E, Brunskill S, Doree C. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. 2008 *Cochrane Database Syst Rev.* CD006536.
303. Lara-Hernandez R, Lozano-Vilardell P, Blanes P, et al. Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg.* 2010;24:287-94.
304. Fan Y, Shen F, Frenzel T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol.* 2010;67:488-97.
305. Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2005;36:859-64.
306. Aaslid R, Markwalder TM, Nornes H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J Neurosurg.* 1982;57:769-74.
307. Arenillas JF, Molina CA, Chacón P, et al. High lipoprotein (a), diabetes, and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology.* 2004;13;63:27-32.
308. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, et al. ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *Circulation.* 2006;113:463-4
309. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. AtheroGene Investigators. Different calculations of ankle-brachial index and their impact on cardiovascular risk prediction. *Circulation.* 2008;118:961-7.
310. Brull DJ, Serrano N, Zito F, et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 2063-69.
311. Pencina MJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Statistical methods for assessment of added usefulness of new biomarkers. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48:1703-11.
312. Wong KS, Li H, Chan YL, et al. Use of transcranial Doppler ultrasound to predict outcome in patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke.* 2000;31:2641-7.
313. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-43.

314. Ovbiagele B, Saver JL, Lynn MJ, et al. WASID Study Group. Impact of metabolic syndrome on prognosis of symptomatic intracranial atherostenosis. *Neurology*. 2006;66:1344-9.
315. Aso Y, Wakabayashi S, Yamamoto R, et al. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes: synergistic effects of plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes Care*. 2005;28:2211-16.
316. Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, et al. Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke*. 2006; 37:2018-23.
317. Shah T, Casas JP, Cooper JA, et al. Critical appraisal of CRP measurement for the prediction of coronary heart disease events: new data and systematic review of 31 prospective cohorts. *Int J Epidemiol*. 2009;38:217-31.
318. Hingorani AD, Shah T, Casas JP, et al. C-reactive protein and coronary heart disease: predictive test or therapeutic target? *Clin Chem*. 2009;55:239-55.
319. Tanne D, Haim M, Boyko V, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future ischemic stroke: a nested case-control study from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study cohort. *Stroke*. 2002;33:2182-6.
320. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation*. 2005;112:976-83.
321. Kardys I, Oei H, Van der Meer I, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and measures of extracoronary atherosclerosis: the Rotterdam study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 631-6.
322. Mannheim D, Herrmann J, Versari D, et al. Enhanced expression of Lp-PLA2 and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*. 2008;39:1448-55.
323. Persson M, Hedblad B, Nelson JJ, et al. Elevated Lp-PLA2 levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 1411-6.
324. Cucchiara BL, Messe S, Sansing L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and C-reactive protein for risk-stratification of patients with TIA. *Stroke*. 2009;40:2332-6
325. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial. *Circulation*. 2006;113: 1745-52.
326. 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.
327. Ogata J, Masuda J, Yutani C, et al. Mechanisms of cerebral artery thrombosis: a histopathological analysis on eight necropsy cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:17-21.

328. Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, et al. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation*. 1999;100:717-22.
329. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:29-38.
330. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, et al. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003;107:391-7.
331. Schaefer EJ, McNamara JR, Asztalos BF et al. Effects of atorvastatin versus other statins on fasting and postprandial c-reactive protein and lipoprotein associated phospholipase A2 in patients with coronary heart disease versus control subjects. *Am J Cardiol*. 2005;95:1025-32.
332. Rosenson RS. Future role for selective phospholipase A2 inhibitors in the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23:93-101.
333. Virani SS, Nambi V. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a marker for atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2007;9:97-103.
334. Vaughan DE. PAI-1 antagonists: the promise and the peril. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2011;122:312-25.
335. Lip GY, Felmeden DC, Dwivedi G. Antiplatelet agents and anticoagulants for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;12: CD003186.
336. Konya H, Hasegawa Y, Hamaguchi T, et al. Effects of gliclazide on platelet aggregation and the plasminogen activator inhibitor type 1 level in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010;59:1294-299.
337. Walter T, Szabo S, Suselbeck T, et al. Effect of atorvastatin on haemostasis, fibrinolysis and inflammation in normocholesterolaemic patients with coronary artery disease: a post hoc analysis of data from a prospective, randomized, double-blind study. *Clin Drug Invest*. 2010;30:453-60.
338. Izuhara Y, Yamaoka N, Kodama H, et al. A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:904-12.
339. Hennan JK, Morgan GA, Swillo RE, et al. Effect of tiplaxtinin (PAI-039), an orally bioavailable PAI-1 antagonist, in a rat model of thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1558-64.
340. Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet*. 2005; 77: 64-77.
341. Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, et al. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*. 2005;178:139-45.
342. D'Aiuto F, Casas JP, Shah T, et al. C-reactive protein (+1444C>T) polymorphism influences CRP response following a moderate inflammatory stimulus. *Atherosclerosis*. 2005; 179:413-17.
343. Kovacs A, Green F, Hansson LO, et al. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2005;178:193-8.

344. Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, et al. C-reactive protein gene haplotypes and risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2006;27:1331-7.
345. Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, et al. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation*. 2006; 113: 1415-23.
346. Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiologic applications. *Clin Chem*. 1997;43:52-58.
347. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem*. 2003;49:1258-71.
348. Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, et al. Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia. *Ann Hum Genet*. 2006;70:705-16.
349. Davey Smith G, Harbord R, Ebrahim S. Fibrinogen, C-reactive protein and coronary heart disease: does Mendelian randomization suggest the associations are non-causal? *QJM*. 2004;97:163-66.
350. Davey Smith G, Lawlor DA, Harbord R, et al. Association of C-reactive protein with blood pressure and hypertension: life course confounding and mendelian randomization tests of causality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1051-56.
351. Casas JP, Shah T, Cooper J, et al. Insight into the nature of the CRP-coronary event association using Mendelian randomization. *Int J Epidemiol*. 2006;35:922-931.
352. Bulut D, Albrecht N, Imöhl M, et al: Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. *Clin Res Cardiol*. 2007; 96: 258-263.
353. Ni G, Liu W, Huang X, et al: Increased levels of circulating SDF-1 α and CD34(+) CXCR4(+) cells in patients with moyamoya disease. *Eur J Neurol*. 2011;18:1304-09.
354. Fadini GP, de Kreutzenberg S, et al. Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis*. 2009;207:213-9.
355. Choi JH, Kim KL, Huh W, et al: Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1246-52.
356. Alzamora MT, Baena-Diez JM, Sorribes M, et al. 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.
357. Johnston SC, Rothwell PM, Nguyen-Huynh MN, et al. Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack. *Lancet*. 2007;369:283-92.