

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

RUI KLEBER DO VALE MARTINS FILHO

**Marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com declínio
cognitivo por doença cerebral de pequenos vasos**

Ribeirão Preto
2022

RUI KLEBER DO VALE MARTINS FILHO

**Marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com declínio
cognitivo por doença cerebral de pequenos vasos**

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Neurociências

Área de concentração: Neurologia clínica

Orientador: Prof. Dr. Octávio Marques Pontes Neto

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda

Ribeirão Preto, 2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Martins-Filho, Rui Kleber do Vale
Marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com declínio cognitivo por doença cerebral de pequenos vasos.
Ribeirão Preto, 2022. 115 p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Neurociências) – Programa de Pós-graduação em Neurologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Orientador: Pontes-Neto, Octávio Marques.

Versão original.

1. Demência vascular.
2. Doença cerebral de pequenos vasos.
3. Glicocálix endotelial.
4. Hipersinal de substância branca.
5. Sindecano-1.
6. Hialuronano.

Nome: MARTINS-FILHO, Rui Kleber do Vale

Título: Marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com declínio cognitivo por doença cerebral de pequenos vasos

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Aprovado em: //2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada ao meus pais, Rui e Márcia, pelo amor incondicional e por me ensinarem o valor inestimável do estudo;

À minha esposa, Kamila, pelo constante suporte e pelo amor traduzido em paciência;

Ao meu filho, Rui Neto, razão das nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Octávio Marques Pontes-Neto, pela liderança, inúmeros ensinamentos e pelo exemplo diário de resiliência e proatividade na busca contínua de um atendimento de qualidade para os pacientes com doenças cerebrovasculares.

Ao meu colega, Dr. Guilherme Riccioppo, pelo inestimável auxílio ao desenvolvimento deste projeto e ao atendimento ambulatorial dos pacientes com demência vascular, proporcionando uma experiência enriquecedora a todos aqueles que com ele trabalham.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda, pela coorientação e participação na idealização e execução do projeto.

À Dra. Maria Clara Zotin, amiga e exemplo de profissional, pela parceria na criação e confecção do trabalho.

Ao Dr. Thiago Goulart, pela parceria e pelo suporte na coleta final de dados deste projeto.

Ao Dr. Júlio Nader, pelo auxílio na análise e processamento das neuroimagens.

Aos amigos e colegas de trabalho, Drs. Frederico Alessio, Francisco Dias, Millene Camilo, Cristiano Milani, Tomasia Frezatti, Renato Ramon, Kamila Santos, Carlos Eduardo, Otávio Vincenzi, grandes companheiros de trabalho e aprendizado mútuo.

À Unidade de Pesquisa Clínica do HCRP, nas pessoas de Elaine e Andréia, pela disponibilidade, hospitalidade e auxílio na coleta e manutenção segura das amostras séricas coletadas no trabalho;

Aos pacientes, fonte de todo o aprendizado e significado de nossa profissão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

*“The intellectual life is not the only road to God, nor the safest, but we find it to be a road, and it may be the appointed road for us. Of course, it will be so only so long as we keep the impulse pure and disinterested. That is the great difficulty. As the author of the *Theologia Germanicai* says, we may come to love knowledge — our knowing — more than the thing known: to delight not in the exercise of our talents but in the fact that they are ours, or even in the reputation they bring us. Every success in the scholar’s life increases this danger. If it becomes irresistible, he must give up his scholarly work. The time for plucking our the right eye has arrived.”*

C.S. Lewis

RESUMO

MARTINS-FILHO, R.K.V. **Marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com declínio cognitivo por doença cerebral de pequenos vasos.** 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introdução - Entende-se por comprometimento cognitivo vascular (CCV) a ampla gama de síndromes de déficit cognitivo cuja doença cerebrovascular (DCV) atua como fator primário e primordial do processo ou colabora direta ou indiretamente com a cadeia de eventos que culminam com o estabelecimento dos sintomas. A doença cerebral de pequenos vasos (DCPV), por sua vez, engloba processos patológicos envolvendo arteríolas perfurantes, capilares e vênulas do sistema nervoso central, com impacto proeminente nas funções cognitivas e motoras e sendo a principal causa de CCV. A disfunção da unidade neurovascular (UNV), conjunto funcional de neurônios, células da glia, células perivasculares e do endotélio, parece ser o elemento-chave na gênese dos processos patológicos que envolvem a DCPV. O glicocálix endotelial (GE), estrutura que recobre a parte luminal do endotélio, apresenta funções primordiais para o bom funcionamento da UNV, e sua degradação pode ser um dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos no CCV por DCPV.

Objetivos – Investigar a relação entre marcadores séricos de lesão do GE e a presença de CCV por DCPV. Secundariamente, avaliar a relação destes marcadores com: 1) escores em teste psicométrico de rastreio (MoCA); 2) escores de funcionalidade nas atividades de vida básica e instrumental (escalas de Katz e Lawton); 3) número de lesões e volume de substância branca na ressonância magnética (RM) de crânio dos pacientes.

Métodos – Estudo unicêntrico, transversal, realizado através da coleta de dados demográficos, fatores de risco cardiovasculares e marcadores séricos de lesão do GE (sindecano-1 e hialuronano) de pacientes com CCV por DCPV do HCRP e de um grupo de funcionários saudáveis (controle) da mesma instituição. Posteriormente, foi realizada segmentação com volumetria das lesões de substância branca presentes na RM dos pacientes com CCV e feita correlação com os níveis dos biomarcadores. Foram realizados, através de métodos de regressão logística e estatística-C, análise das variáveis relacionadas à presença de CCV, bem como realizados testes de correlação (Spearman) entre níveis dos marcadores e performance no MoCA, funcionalidade, número de lesões de substância branca e volume agregado das lesões.

Resultados – No período de julho de 2019 a março de 2020, foram recrutados 22 pacientes com CCV por DCPV, sendo avaliados em relação a um banco de dados de 22 indivíduos

saudáveis. Pacientes com CCV, na análise univariada, mostraram-se mais idosos, com maior prevalência de diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS), menor funcionalidade e maiores níveis de sindecano-1 (78,4 x 24; $p < 0,01$). Não houve diferença nos valores do hialuronano entre os grupos. Na análise multivariada, apenas idade (OR 1,35; IC 1,04 – 1,76; $p = 0,02$) e níveis de sindecano-1 (OR 1,08; IC 1,01 – 1,15; $p = 0,01$) foram variáveis independentes para presença de CCV. A estatística-C demonstrou uma curva ROC com área sob a curva de 0,78 (IC 0,64 – 0,92) para a capacidade do sindecano-1 em detectar presença de CCV. Houve uma correlação entre os níveis de sindecano-1 com resultados do MoCA (coeficiente de correlação = - 0,34; $p = 0,02$) e não foram observadas associações entre os dois marcadores e a funcionalidade e carga lesional de substância branca dos pacientes.

Conclusões – O sindecano-1, ao contrário do hialuronano, apresenta-se como um potencial marcador de CCV em pacientes com DCPV.

Palavras-chave: Demência vascular. Doença cerebral de pequenos vasos. Glicocálix endotelial. Hipersinal de substância branca. Sindecano-1. Hialuronano.

ABSTRACT

MARTINS-FILHO, R.K.V. **Markers of endothelial glycocalyx damage in patients with vascular cognitive impairment associated with cerebral small vessel disease.** 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Background – Vascular cognitive impairment (VCI) accounts for various cognitive symptoms caused directly or indirectly by cerebrovascular disease. Cerebral small vessel disease (cSVD) involves a myriad of pathogenic mechanisms affecting small vessels of the brain, including small arteries, arterioles, capillaries, and small veins. It significantly impacts motor and cognitive functions and is the leading cause of VCI. Neurovascular unit (NVU) dysfunction, a strategic congregate of neurons, glia cells, perivascular cells, and endothelium, appears to play a key role in the development of cSVD. The endothelial glycocalyx (EG), the layer lining the vascular endothelium, is a pivotal player in maintaining the proper function of NVU. Its degradation may be one of the main mechanisms involved in VCI due to cSVD.

Objectives – We aimed to investigate the relationship between markers of EG damage and VCI related to cSVD. After that, we sought to examine the association of these markers with:

1. MoCA scores.
2. Index of independence in activities of daily living (Katz and Lawton scales).
3. The number of white matter lesions and the total volume of white matter hyperintensities (WMH) showed in the patients' brain magnetic resonance (MRI).

Methods – Unicentric, cross-sectional study based on collecting clinical data and serum samples to quantify EG damage markers (syndecan-1, hyaluronan) of VCI related to cSVD patients and a control group derived from a dataset of healthy workers from the same institution. Then we carried out through an automatic logarithm the segmentation and volumetric evaluation of white matter lesions shown on brain MRI of the patients. We set up a logistic regression model and c-statistics to identify the independent variables related to VCI and investigate the accuracy of syndecan-1 in detecting VCI. We studied the association of the biomarkers and MoCA scores, index of independence in activities of daily living, and white matter lesion burden, respectively, based upon matrix correlations (Spearman).

Results – Between July 2019 and March 2020, we studied 22 patients with VCI associated with cSVD and compared them with a dataset of 22 healthy workers from the same institution.

In the univariate analysis, patients with VCI were older, had a higher prevalence of diabetes mellitus and hypertension, had a worse index of independence for daily activities, and had

higher levels of syndecan-1 (78,4 vs. 24; $p < 0,01$). There was no difference in hyaluronan levels between both groups. In multivariate analysis, only age (OR 1,35; CI 1,04 – 1,76; $p = 0,02$) and syndecan-1 levels (OR 1,08; CI 1,01 – 1,15; $p = 0,01$) related to VCI. The ROC curve of syndecan-1 levels to predict VCI had a area under de curve (AUC) of 0,78 (CI 0,64 – 0,92) and there was a correlation between syndecan-1 levels and MoCA scores ($\rho = - 0,34$; $p = 0,02$). There were no correlations between syndecan-1 and hyaluronan levels and index of independence and white matter lesion burden, respectively.

Conclusions - Syndecan-1, but not hyaluronan, is a potential biomarker for VCI associated with cSVD.

Keywords: Vascular dementia. Cerebral small vessel disease. Endothelial Glycocalyx. White matter hyperintensity. Syndecan-1. Hyaluronan.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCV: comprometimento cognitivo vascular

DCV: doença cerebrovascular

DCPV: doença cerebral de pequenos vasos

UNV: unidade neurovascular

GE: glicocálix endotelial

MoCA: *montreal cognitive assessment*

RM: ressonância magnética

HCRP: hospital das clínicas de ribeirão preto

DM: diabetes mellitus

HAS: hipertensão arterial sistêmica

OR: *odds ratio*

IC: intervalo de confiança

ROC: *receiver-operating characteristic*

VCI: *vascular cognitive impairment*

cSVD: *cerebral small vessel disease*

NVU: *neurovascular unit*

EG: *endothelial glycocalyx*

WMH: *white matter hyperintensities*

MRI: *magnetic resonance imaging*

AUC: *area under curve*

DA: doença de alzheimer

AA: angiopatia amilóide

CCL: comprometimento cognitivo leve

DB: doença de biswanger

DVa: demência vascular

AVC: acidente vascular cerebral

CCL: comprometimento cognitivo leve

MMP: metaloproteinase

BHE: barreira hemato-encefálica

ICAM-1: molécula de adesividade intercelular 1

ICAM-2: molécula de adesividade intercelular 2

V-CAM-1: moléculas de adesão vascular

PECAM-1: moléculas de adesão endotelial plaquetária

SNC: sistema nervoso central

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínico-demográficas e laboratoriais da população estudada....	51
Tabela 2 - Análise multivariada (regressão logística) para presença de CCV por DCPV...	51
Tabela 3 - Testes de correlação (Spearman) entre biomarcadores e funcionalidade.....	54
Tabela 4 - Testes de correlação entre volume de carga lesional, número de lesões de substância branca e os biomarcadores.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Marcadores radiológicos da doença cerebral de pequenos vasos...	26
Figura 2 - Desenho esquemático ilustrando a relação entre endotélio, barreira hematoencefálica (BHE) e os principais agentes envolvidos no funcionamento da unidade neurovascular.....	29
Figura 3 - Esquema ilustrativo do glicocálix endotelial. Observa-se sua distribuição sobre as células endoteliais e sua composição química.....	32
Figura 4 - Desenho esquemático da passagem de hemácias no compartimento vascular em situação normal e com o glicocálix danificado (PBR com aumento de diâmetro).....	36
Figura 5 - Exemplo de segmentação de hipersinal de substância branca de origem vascular presumida através de método automatizado, LPA.....	44
Figura 6 - Fluxograma do estudo e registro do rastreo de potenciais candidatos.....	49
Figura 7 - Análise de curva ROC envolvendo o Sindecano-1 e a presença de comprometimento cognitivo vascular.....	52
Figura 8 - Estatística-C com identificação de ponto-ótimo na curva para determinação de sensibilidade e especificidade do sindecano-1 para presença de comprometimento cognitivo vascular.....	53
Figura 9 - Correlação (Spearman) entre níveis de Sindecano-1 e escores do MoCA.....	53

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. COMPROMETIMENTO COGNITIVO VASCULAR.....	20
1.1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS E DEFINIÇÃO.....	20
1.1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.1.3. ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA.....	22
1.1.4. ASPECTOS CLÍNICOS.....	23
1.1.5. DIAGNÓSTICO.....	24
1.1.6. TRATAMENTO.....	24
1.2. DOENÇA CEREBRAL DE PEQUENOS VASOS (DCPV).....	25
1.2.1. DEFINIÇÃO DA DCPV E SEUS PRINCIPAIS MARCADORES RADIOLÓGICOS	25
1.2.2. RELAÇÃO DA DOENÇA DE PEQUENOS VASOS COM DECLÍNIO COGNITIVO	26
1.2.3. FISIOPATOLOGIA E MARCADORES BIOQUÍMICOS DA DCPV	27
1.2.4. GLICOCÁLIX ENDOTELIAL	29
1.2.4.1. COMPOSIÇÃO	30
1.2.4.2. FUNÇÕES	32
1.2.4.3. APRESENTAÇÃO EM PROCESSOS PATOLÓGICOS.....	33
1.2.4.4. O GLICOCÁLIX ENDOTELIAL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	34
OBJETIVOS.....	37
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. PRINCIPAL.....	38
2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	38
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
3.1. TIPO DE ESTUDO.....	40
3.2. CASUÍSTICA	40
3.2.1. FONTE	40
3.2.2. ELEGIBILIDADE.....	40
3.2.3. AVALIAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	41
3.2.4. AVALIAÇÃO COGNITIVA.....	43
3.2.5. AVALIAÇÃO DE FUNCIONALIDADE.....	43
3.2.6. PROTOCOLO DE NEUROIMAGEM	43
3.2.7. PROTOCOLO DE SEGMENTAÇÃO DE LESÕES DE SUBSTÂNCIA BRANCA NA RM	43
3.2.8. COLETA DO MATERIAL (BIOMARCADORES).....	44
3.2.9. ASPECTOS ÉTICOS	45
3.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4. RESULTADOS.....	49
4.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS	50
4.2. ACHADOS LABORATORIAIS	50
4.3. AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOS BIOMARCADORES COM CCV	51
4.4. AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO SINDECANO-1 NA IDENTIFICAÇÃO DE CCV POR DCVP	52

4.5. ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE SINDECANO-1 E HIALURONANO E OS RESULTADOS DO MOCA	53
4.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE SINDECANO-1, HIALURONANO E A FUNCIONALIDADE.....	54
4.7. ASSOCIAÇÃO ENTRE VOLUME DE HIPERSINAL DE SUBSTÂNCIA BRANCA E NÍVEIS DE SINDECANO-1 E HIALURONANO.	54
5. DISCUSSÃO.....	56
5.1. PARTICULARIDADES DO GLICOCÁLIX CEREBRAL: A ÚLTIMA BARREIRA DA MICROCIRCULAÇÃO?.....	57
5.2. SINDECANO-1 COMO MARCADOR DE CCV POR DCPV: UM ACHADO INÉDITO?	58
5.2.1. ACURÁCIA DO SINDECANO-1 NA DETECÇÃO DE CCV.....	59
5.3. ANÁLISE DO DESEMPENHO DO HIALURONANO COMO MARCADOR DE CCV POR DCPV.....	59
5.4. ASSOCIAÇÃO DOS BIOMARCADORES COM O MOCA	61
5.5. ASSOCIAÇÃO DOS BIOMARCADORES COM O GRAU DE FUNCIONALIDADE	61
5.6. HIPERSINAL DE SUBSTÂNCIA BRANCA DE ETIOLOGIA VASCULAR PRESUMIDA: SEM ASSOCIAÇÃO COM OS BIOMARCADORES	61
5.7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	63
6. CONCLUSÕES.....	66
6.1. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS.....	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Comprometimento cognitivo vascular

1.1.1. Aspectos históricos e definição

Para melhor entender o espectro particular do comprometimento cognitivo vascular (CCV) em sua diversidade e mudança de entendimento ao longo do tempo, é preciso compreender alguns aspectos históricos construídos ao longo da história.

A etiologia vascular é primeiramente destacada em 1894, por Otto Biswanger. Após avaliação de uma série de oito casos com presença marcante de alterações anatomopatológicas descritas como “denervação cerebral aterosclerótica”, o autor retratou essa condição como uma “encefalite subcortical crônica progressiva” (BLASS; HOYER; NITSCH, 1991). Oito anos após, Alois Alzheimer cunhou o termo “Doença de Biswanger” (DB) a partir do trabalho do renomado colega, termo que se tornaria por muito tempo sinônimo do protótipo de demência vascular (DVa) (CAPLAN, 1995).

Com o passar dos anos, a descoberta de outros fenótipos e estruturas corticais envolvidas, diferentes mecanismos fisiopatológicos, bem como sua associação a outros quadros neurodegenerativos, proporcionaram um entendimento mais amplo do CCV, definindo-o como uma ampla gama de síndromes de déficit cognitivo cuja doença cerebrovascular (DCV) atua como fator primário e primordial do processo ou colabora direta ou indiretamente com a cadeia de eventos que culminam com o estabelecimento dos sintomas. A DB, por sua vez, passou a ser entendida como um termo predecessor e representativo do que seria o CCV desenvolvido através da doença cerebral de pequenos vasos (DCPV), a principal causa de CCV hoje em dia (HACHINSKI et al., 2006; SMITH, 2017).

1.1.2. Epidemiologia

Com o desenvolvimento de critérios diagnósticos mais abrangentes e o aprimoramento das técnicas de ressonância (RM), o CCV passou a ser mais detectado e mais bem diagnosticado, permitindo uma noção melhor da real prevalência desta entidade e do papel da DCV como fator associado no desenvolvimento de outras demências.

Apesar da DVa pura ser encontrada somente em cerca de 10% dos casos de demência, acredita-se que, em sua forma mista, ela seja encontrada em até 30 a 40% dos pacientes, com prevalência estimada de 1,6% entre indivíduos acima de 65 anos, o que faz com que ocupe o segundo lugar como causa de demência no mundo, estando apenas atrás da doença de Alzheimer (DA) (FELDMAN et al., 2003; SATIZABAL et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2007). Estudos populacionais apontam a DCPV como responsável por até 33% do risco de demência, enquanto a angiopatia amilóide (AA), especificamente (SONNEN et al., 2007), e a DCV de múltiplas patologias encontram-se responsáveis por, respectivamente, 7 e 9% do risco (MATTHEWS et al., 2009).

O comprometimento cognitivo leve (CCL) de causa vascular, por sua vez, encontra-se presente como causa única em cerca de 16% dos casos e sobe para 17% quando associada à patologia de DA (SCHNEIDER et al., 2009). Cerca de 46% dos indivíduos com CCL vascular progridem para demência em cinco anos, com metade desses casos sendo atribuídos à progressão ou recorrência da DCV (WENTZEL et al., 2001).

Os fatores de risco presentes no CCV compreendem basicamente aqueles do acidente vascular cerebral (AVC), sendo os principais a hipertensão arterial (HAS), idade avançada, tabagismo, diabetes mellitus (DM), dislipidemia, sedentarismo, doença coronariana, fibrilação atrial e obesidade (SKOOG, 1994). Esses fatores, associados a condições pré-morbidas (baixa reserva cognitiva, microangiopatia difusa, atrofia global ou mesial temporal, deposição de beta-amilóide), complicações relacionadas ao AVC (delirium, infecção, crises epiléticas) e

características particulares do evento ictal (AVC hemorrágico, localização em hemisfério dominante, afasia, evento recorrente) aumentam sobremaneira o risco de demência após o AVC, denotando a importância de se realizar uma estratificação de risco pautada nesses fatores, a fim de se otimizar a detecção de casos de CCV e diminuir complicações e morbidade associadas (LIU et al., 2015; PENDLEBURY; ROTHWELL, 2009).

1.1.3. Etiologia e fisiopatologia

De maneira geral, qualquer mecanismo envolvido na DCV conseqüentemente encontra-se potencialmente envolvido no desenvolvimento do CCV. Deste modo, uma miríade de manifestações, isquêmicas e hemorrágicas, fazem parte desse espectro, podendo ser divididas nos seguintes tipos: infartos de grandes artérias ou múltiplos infartos, infartos estratégicos, lesões de substância branca e lacunas, hemorragias cerebrais, hipoperfusão global, causas mais raras (vasculites, heranças monogênicas etc.) e patologia mista (vascular e degenerativa) (SACHDEV et al., 2014). Para fins práticos, o CCV pode ser causado basicamente por quatro grandes grupos etiológicos: infarto em área estratégica, doença de grande artéria com múltiplos infartos, DCPV e patologia mista (SKROBOT et al., 2017). Nesse contexto, a DCPV aparece como a principal causa de CCV, entidade que será detalhada mais adiante.

O estabelecimento dessas patologias pode culminar no mau funcionamento de uma área estratégica ou na diminuição da resiliência cerebral, diminuindo a reserva cognitiva, comprometendo mecanismos de autorregulação cerebral e de integridade da unidade neurovascular (UNV), estabelecendo uma disfunção na conectividade de redes neurais integradas e, em última análise, enfraquecendo os principais mecanismos compensatórios cerebrais que evitam o surgimento dos sintomas cognitivos (TER TELGTE et al., 2018).

1.1.4. Aspectos clínicos

Existem duas grandes síndromes na DVa, sendo a primeira representada por síndromes demenciais que se desenvolveram a partir de um AVC agudo e a segunda referente àqueles pacientes que não apresentaram história de evento ictal recente (DICHGANS; LEYS, 2017).

No primeiro caso, conhecido como demência pós-AVC, observa-se uma relação de tempo entre o evento agudo e o estabelecimento dos sintomas, podendo estes evoluírem de maneira marcada em relação ao ictus e com estabilidade e até melhora ao longo dos meses subsequentes, no caso de infartos estratégicos, ou apresentarem um padrão de deterioração “em degraus”, principalmente quando associados a eventos cerebrovasculares recorrentes. Nesses casos, os sintomas são manifestados principalmente a partir das áreas eloquentes acometidas, podendo, de forma geral, apresentar acometimento de funções executivas com preservação de memória episódica e presença de sinais corticais, como apraxia ou afasia (SACHDEV et al., 2004).

No segundo caso, representado principalmente pela DCPV, não há relato de evento agudo recente, com o desenvolvimento dos sintomas se dando de forma gradual e progressiva, com presença de lesões cerebrovasculares silentes que culminam no desenvolvimento de uma síndrome demencial que acomete sobremaneira a função executiva e a velocidade de procedimento. Nestes casos, os pacientes tendem a apresentar melhor rendimento nos testes de evocação, memória verbal e episódica em relação à DA (DEBETTE et al., 2010; VERMEER et al., 2002, 2003).

Além dos sintomas cognitivos, o paciente com CCV costuma apresentar alterações neuropsiquiátricas (apatia, depressão, psicose, afeto pseudobulbar) e motoras (alteração de marcha, lentificação motora, parkinsonismo de predomínio em membros inferiores) (MORETTI et al., 2006; THANVI; LO; ROBINSON, 2005). O quadro pode ser composto,

ainda, por alterações relativas às lesões agudas, apresentando sinais de déficit focal motor, sensitivo ou afasia (STAEKENBORG et al., 2008).

1.1.5. Diagnóstico

A primeira ferramenta diagnóstica utilizada foi o escore de Hachinski na década de 70 (HACHINSKI et al., 1975). Apesar de muito utilizada, tendia a privilegiar a apresentação de demência pós-AVC em detrimento dos casos que se estabeleciam com lesões cerebrovasculares silenciosas, dando destaque a sinais como déficit focal e estabelecimento abrupto dos sintomas. Da mesma maneira, o critério NINDS-AIREN subestimava a prevalência dos casos de CCV, uma vez que requeria a presença de déficit mnéstico como critério para estabelecimento de demência (ROMÁN et al., 1993).

Hoje em dia, os critérios mais utilizados são da *American Heart Association*, do DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022) e do VAS-COG (SACHDEV et al., 2014), onde partem de três pressupostos básicos: a diferenciação entre CCL e demência vascular (no caso do DSM, “distúrbio *minor vs major*”), evidência de DCV, seja através da história clínica, seja através da neuroimagem e, por fim, o julgamento de que tais lesões são suficientes para o estabelecimento de uma síndrome cognitiva. Desta forma, os critérios tornaram-se mais abrangentes e passaram a contemplar a entidade em sua variabilidade clínica com diferentes fenótipos, incluindo a apresentação da sua principal causa, a DCPV.

1.1.6. Tratamento

O tratamento do CCV é baseado no manejo adequado dos fatores de risco, na identificação da etiologia do evento vascular e na abordagem de sintomas neuropsiquiátricos, visando ao tratamento de sintomas como apatia, agressividade, alterações do sono, depressão e psicose. Medidas não farmacológicas e medicamentosas, como a prescrição de antidepressivos

(inibidores da recaptação de serotonina e antidepressivos duais) e antipsicóticos, formam a base terapêutica desses quadros. (SMITH, 2016). Por sua vez, o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase tem um papel modesto nos casos em que há suspeita de patologia mista associada à DA, presente em 30% dos casos de CCV (VAN DER FLIER et al., 2018). Revisões envolvendo meta-análises mostraram que tais medicações possuem um efeito benéfico no desempenho cognitivo, porém sem significância clínica (CHEN et al., 2016).

1.2. Doença cerebral de pequenos vasos (DCPV)

1.2.1. Definição da DCPV e seus principais marcadores radiológicos

O termo DCPV engloba processos patológicos envolvendo arteríolas perfurantes, capilares e vênulas do sistema nervoso central com impacto proeminente nas funções cognitivas e motoras. Com alta prevalência, acredita-se que sejam responsáveis por até 45% dos casos de demência e 20% dos eventos cerebrovasculares no mundo (destes, representam 25% dos eventos isquêmicos) (PANTONI, 2010) implicando alto grau de incapacidade funcional para pacientes e sobrecarga para familiares e cuidadores.

Além disso, com a mudança de expectativa de vida da população, tal síndrome destaca-se como um grupo de marcadores-chave do processo de senescência, de maneira que compreendê-los significa avançar no entendimento de fenômenos intrínsecos ao envelhecimento e dos efeitos das principais comorbidades presentes nesta faixa etária.

Comumente, a DCPV é representada por uma série de alterações radiológicas na substância branca e cinzenta subcortical, incluindo pequenos infartos subcorticais agudos, hiperintensidades de substância branca, infartos lacunares, aumento de espaços perivasculares, microhemorragias cerebrais e atrofia (figura 1) (WARDLAW et al., 2013). A variedade de marcadores acompanha manifestações clínicas heterogêneas, que compreendem desde apresentações de AVC agudo, com síndromes lacunares típicas (motora pura, sensitiva pura,

sensitivo-motora, hemiparesia atáxica e *disartria-clumsy hand*), a quadros mais indolentes e progressivos de comprometimento cognitivo, sintomas envolvendo equilíbrio, deambulação e distúrbios do controle esfíncteriano (BOULOS et al., 2011; SELNES; VINTERS, 2006).

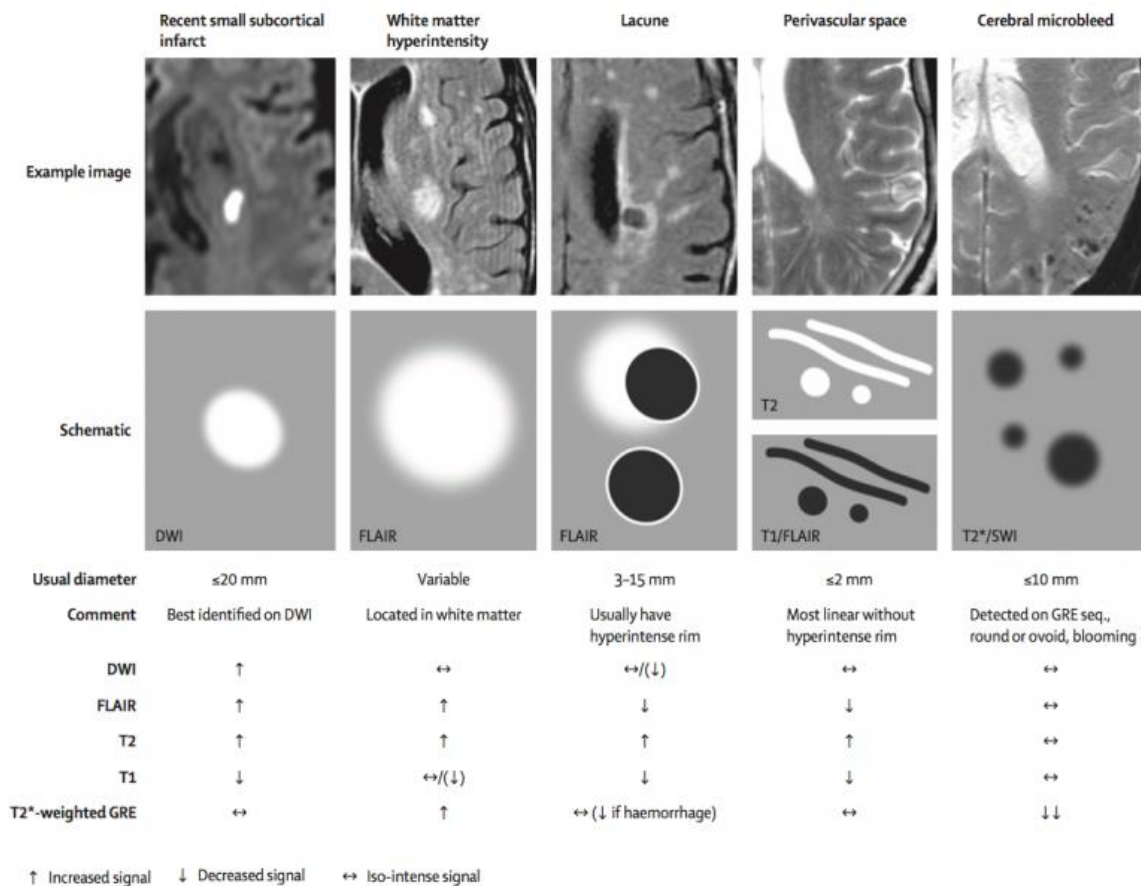


Figura 1. Marcadores radiológicos da doença cerebral de pequenos vasos (adaptado de WARDLAW et al., 2013).

1.2.2. Relação da doença de pequenos vasos com declínio cognitivo

Nos últimos anos, tem havido grande interesse na relação da DCPV e declínio cognitivo. Antes associado principalmente a sequelas de infartos estratégicos clinicamente definidos (a chamada demência por multi-infartos) (ROMÁN et al., 1993), o entendimento do CCV tem evoluído com a definição de novas terminologias e critérios diagnósticos mais acurados e atualizados (“American Psychiatric Association”, 2014; GORELICK et al., 2011; SACHDEV et al., 2014). A variabilidade dos fenótipos relacionados ao CCV, a diferença dos critérios

adotados e, principalmente, a concomitância com outros processos neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer, fazem desta entidade um desafio diagnóstico para clínicos e pesquisadores, ao passo que dificulta o desenho de estudos clínicos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de terapias eficazes (GORELICK et al., 2011).

Neste cenário, a presença de infartos lacunares vem se associando ao desenvolvimento de declínio cognitivo. Fatores como o número de lesões e suas localizações atuam como importantes preditores, como se observa em estudos relacionando a presença de lacunas talâmicas, no putâmen e globo pálido a menores rendimentos no miniexame do estado mental, função executiva e controle e velocidade motores. Por sua vez, os pequenos infartos ditos silenciosos contradizem a própria denominação ao associarem-se, em conjunto com as alterações de substância branca, a déficits de função executiva e, inclusive, de memória episódica (MIYAO et al., 1992; SAMUELSSON; SÖDERFELDT; OLSSON, 1996; TATEMICHII et al., 1992; YAMAMOTO et al., 2002).

No Brasil, esses achados são especialmente importantes, onde a prevenção de fatores de riscos tradicionais para DCV é menos eficiente em relação a países desenvolvidos. De fato, um estudo neuropatológico realizado com o banco de cérebros da Faculdade de Medicina da USP demonstrou presença de patologia vascular significativa em cerca de 35% dos casos analisados, o que sugere uma prevalência ainda maior de DVa em países em desenvolvimento (GRINBERG et al., 2013).

1.2.3. Fisiopatologia e marcadores bioquímicos da DCPV

Formada por neurônios, glia e células perivasculares e vasculares, a UNV, composta pelo conjunto destas estruturas, atua através de uma rede complexa de interações funcionais e anatômicas, visando ao equilíbrio entre oferta e demanda energética por um suprimento sanguíneo constante e autorregulado (IADECOLA; NEDERGAARD, 2007; MOSKOWITZ;

LO; IADECOLA, 2010). Receptores endoteliais especializados e sensíveis a estímulos mecânicos e bioquímicos liberam moléculas como óxido nítrico, prostanóides e endotelina, efetivando funções que vão desde a distribuição sanguínea ao balanço hemostático e resposta imunológica (ANDRESEN; SHAFI; BRYAN, [s.d.]; SERRATS et al., 2010).

Junções endoteliais associadas a transportadores de membrana coordenam a passagem entre a circulação sanguínea e o cérebro, estabelecendo um fluxo controlado de eliminação de subprodutos do sistema nervoso central, como a própria beta-amilóide, e produção de fatores endoteliais tróficos envolvidos no desenvolvimento, reparo e plasticidade cerebrais (GUO et al., 2008; WARD; LAMANNA, 2004).

A disfunção da UNV parece ser o elemento-chave na gênese dos processos patológicos que envolvem a doença de pequenos vasos, tendo importância também na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como a DA. Pacientes com essas doenças apresentam alterações de microvasculatura, que se encontra reduzida em volume e com alto grau de tortuosidade e espessamento. De fato, a proteína amilóide aparece como potente vasoconstritor e supressor de respostas endoteliais mediadas, contribuindo para um estado de hipoperfusão crônica observado nestas condições (IADECOLA, 2004; IADECOLA; PARK; CAPONE, 2009; ZACCHIGNA; LAMBRECHTS; CARMELIET, 2008).

A isquemia e hipóxia decorrentes induzem a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória e no reparo, levando a um aumento na expressão de metaloproteinases (MMP) da matriz extracelular, quebra de barreira hemato-encefálica (BHE) e entrada de proteínas proinflamatórias no sistema nervoso central. Neste contexto, marcadores bioquímicos de disfunção de BHE e lesão endotelial surgem como possíveis substratos para a identificação de estágios precoces na evolução dessas enfermidades (FARRALL; WARDLAW, 2009; MARTINS-FILHO et al., 2021; TRAPP; STYS, 2009; YANG et al., 2007).

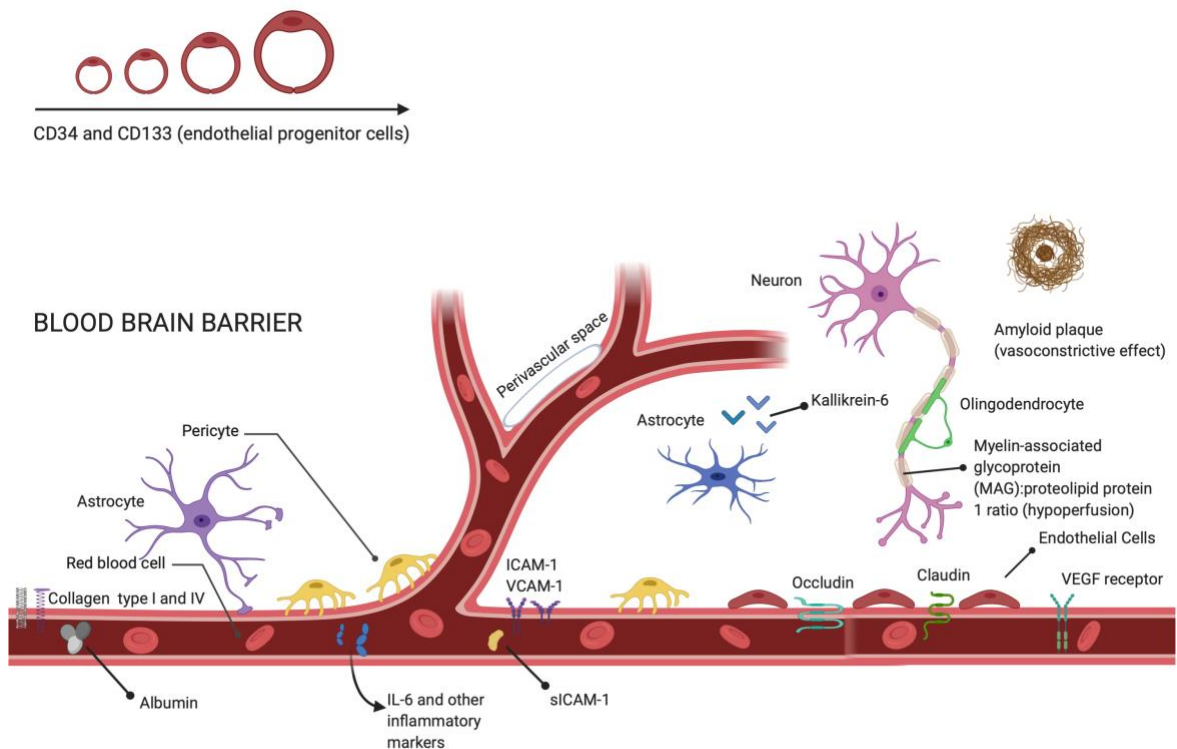


Figura 2. Desenho esquemático ilustrando a relação entre endotélio, barreira hematoencefálica (BHE) e os principais agentes envolvidos no funcionamento da unidade neurovascular (adaptado de MARTINS-FILHO et al., 2020)

1.2.4. Glicocálix endotelial

O glicocálix endotelial (GE) é uma estrutura composta principalmente de proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas que recobre a parte luminal do endotélio e tem sido cada vez mais estudada nas últimas décadas, principalmente em condições fisiopatológicas de processos vasculares (REITSMA et al., 2007).

O interesse nesta estrutura começou a partir da observação de que o hematócrito de determinados capilares variava conforme a ativação de determinados agentes no sistema vascular, e que o uso de enzimas capazes de degradar estruturas presentes no glicocálix, como o heparan sulfato, acabavam por comprometer esses mecanismos reológicos. Desta maneira, o glicocálix passou a ser entendido como um ator importante na regulagem de parâmetros

hematológicos e na dinâmica dos processos vasculares da microcirculação, passando a ser entendido como um potencial alvo de disfunção endotelial em diferentes cenários de patogenicidade (KLITZMAN; DULING, 1979; LIPOWSKY; KOVALCHECK; ZWEIFACH, 1978; REITSMA et al., 2007; SARELIUS; DULING, 1982).

1.2.4.1. Composição

O GE é uma camada rica de carboidratos, onde proteoglicanas e glicoproteínas são consideradas a espinha dorsal de sua estrutura, formando uma rede onde substâncias solúveis oriundas do endotélio e do plasma se ligam direta ou indiretamente através de seus componentes. Esta rede de substâncias estabelece uma dinâmica de equilíbrio com o fluxo sanguíneo, que, por sua vez, influencia diretamente sua composição e espessura. Além disso, o glicocálix é resultado de um processo dinâmico onde enzimas envolvidas em biossíntese e fatores de estresse e estiramento estabelecem um balanço que resulta na arquitetura e estrutura geométrica deste, portanto muitas vezes difícil de delimitá-lo espacialmente. Ao final, o que se observa é um agregado de proteoglicanas, glicoproteínas e substâncias solúveis que interagem entre si em diferentes conformações, estabelecendo uma multitude de funções interconectadas, onde a mudança de um de seus constituintes pode afetá-lo como um todo (REITSMA et al., 2007).

As proteoglicanas são compostas por uma proteína basal a qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas são ligadas. As diferentes formatações dessas cadeias, bem como a variedade da proteína basal no que diz respeito a seu tamanho, número de cadeias associadas e relação com a membrana endotelial determinam várias estruturas diferentes, onde o sindecano-1 é a proteoglicana transmembrana mais comum do glicocálix endotelial (CAREY, 1997; FRANSSON et al., 2004; REITSMA et al., 2007).

As glicosaminoglicanas são polímeros lineares de dissacarídeos com vários comprimentos, modificáveis por processos de sulfatação e acetilação e compostos por ácido urônico e hexosamina. O padrão de sulfatação e qual ácido urônico é incorporado é o que termina por definir a classificação dessas substâncias, compostas principalmente por cinco tipos: dermatan sulfato, heparan sulfato, sulfato de condroitina, queratosulfato e hialuronano (ESKO; SELLECK, 2002; MALAVAKI et al., 2008; REITSMA et al., 2007).

As glicoproteínas são moléculas relativamente pequenas que, neste contexto, compõem principalmente moléculas de adesão endotelial e componentes do sistema de coagulação e fibrinolítico.

As três famílias de glicoproteínas que compõem as moléculas de adesividade endotelial são as selectinas, integrinas e imunoglobulinas. Selectinas detectadas no endotélio são as e-selectinas e as p-selectinas, ambas envolvidas nas interações entre células brancas e endoteliais. As integrinas são moléculas heterodiméricas envolvidas nos processos de ativação plaquetárias e ligação com a membrana basal. Além disso, essas moléculas parecem exercer papel importante, através da interação com a matriz subendotelial, na promoção da angiogênese. Por sua vez, a superfamília das imunoglobulinas compõe as moléculas de adesividade intercelular (ICAM-1 e ICAM-2), as moléculas de adesividade vascular (V-CAM 1) e as moléculas de adesividade endotelial e plaquetária (PECAM-1), funcionando como mediadoras na relação de leucócitos e plaquetas com o endotélio (REITSMA et al., 2007). Ao lado dessas três superfamílias, existem também outras glicoproteínas envolvidas na ligação de fatores envolvidos na coagulação e na mediação da interação entre plaquetas e células de ativação endotelial (REITSMA et al., 2007).

Entremeados nessas cadeias formadas por glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas, existem componentes solúveis derivados ambos do endotélio e do plasma

que contribuem significativamente para a importância funcional do glicocálix, promovendo estabilidade ao complexo através da ligação com as mais variadas estruturas deste.

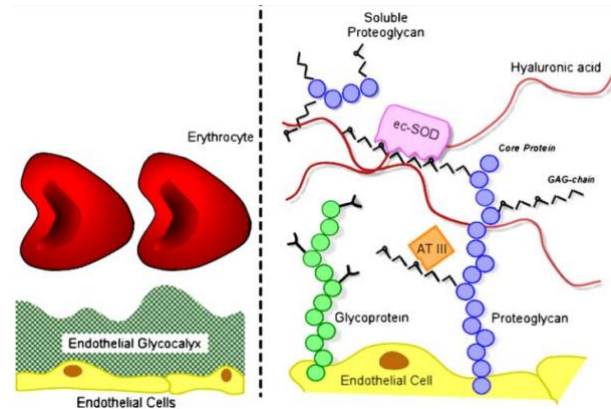


Figura 3. Esquema ilustrativo do glicocálix endotelial. Observa-se sua distribuição sobre as células endoteliais e sua composição química (adaptado de REITSMA et al., 2007).

1.2.4.2. Funções

Localizado estrategicamente e composto por diferentes moléculas em variadas configurações, o glicocálix é um mediador importante da função endotelial, compondo primordialmente um papel importante na permeabilidade vascular, atuando como uma barreira física e elétrica de proteção ao endotélio. A estrutura anatômica restringe a passagem de moléculas maiores, e a presença de glicosaminoglicanas sulfatadas estabelecem uma rede carregada negativamente de proteção em relação à corrente sanguínea, regulando a passagem, por exemplo, de albumina pela membrana vascular. Além de estabelecer uma restrição a determinadas moléculas, o glicocálix é também capaz de influenciar as interações entre células sanguíneas e parede vascular, poupando o endotélio da interação constante com leucócitos, hemácias e plaquetas (HENRY; DULING, 1999; UEDA et al., 2004; VINK; DULING, 2000).

A presença do glicocálix tem também um importante papel no controle local da viscosidade e do hematócrito, de maneira que mudanças em sua espessura tem consequência

importante nas propriedades reológicas da microcirculação (LIPOWSKY, 2005; PRIES; SECOMB, 2003).

Ao passo que o endotélio está susceptível a forças de estiramento e pressão, a transformação de forças mecânicas em sinais bioquímicos passa pelo glicocálix, que adequa, por sua vez, a produção de óxido nítrico ao grau de estímulos mecânicos aplicados, onde moléculas como o hialuronano e o heparan sulfato estabelecem papel importante nesta função (MOCHIZUKI et al., 2003; RUBANYI; ROMERO; VANHOUTTE, 1986).

Por fim, o glicocálix age como um centro de controle do ambiente microcirculatório, sendo capaz de apresentar enzimas e seus receptores ao endotélio, regular e estabelecer um gradiente de concentração para fatores de crescimento regulados por determinados genes e ter um papel protetor da vasculatura através da regulação de processos protrombóticos e inflamatórios, promovendo a ligação endotelial de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (LI et al., 1998; REITSMA et al., 2007).

1.2.4.3. Apresentação em processos patológicos

Estando envolvido em múltiplas funções, acredita-se que o glicocálix tenha uma função importante na fisiopatologia de múltiplas condições, onde o comprometimento de sua estrutura desencadeia uma série de processos que culminam, em última análise, em uma disfunção da UNV e conseqüentemente uma perda de mecanismos fundamentais para o bom funcionamento da microcirculação.

Estudos tem demonstrado, por exemplo, que estados de hiperglicemia, como no caso do DM, são capazes de diminuir até pela metade o volume do glicocálix quando comparado a indivíduos normais, o que pode aumentar a permeabilidade vascular e contribuir com complicações microvasculares (NIEUWDORP et al., 2006). Já em situações de hipoperfusão, onde a disfunção microvascular é um marcador patogênico importante na formação de edema

tecidual e destacamento da membrana basal, a injúria ao glicocálix parece ter uma atuação importante neste fenômeno, aumentando adesividade leucocitária e inflamação, estresse oxidativo e, por fim, descontrole na regulação de substâncias pela parede vascular (OLIVER et al., 1991). Neste cenário, a destruição de cadeias de glicosaminoglicanas levam a uma disfunção endotelial, onde estudos apontam, por exemplo, que a infusão de hialuronano exógeno é capaz de diminuir a repercussão de lesões de isquemia/reperfusão (MULIVOR; LIPOWSKY, 2004).

Apesar de principalmente envolvido em doenças de pequena artéria, o glicocálix endotelial tem demonstrado uma ação destacada no desenvolvimento da aterosclerose, onde a perda do glicocálix endotelial acaba por promover aumento de estresse oxidativo e aumento na oxidação plasmática do colesterol LDL, contribuindo teoricamente para um cenário propício à instabilidade de placas ateroscleróticas. De fato, estudos tem demonstrado correlação entre níveis elevados de sindecano-1 e síndrome coronariana aguda, além de redução nas dimensões do glicocálix em indivíduos com dieta rica em gorduras e hiperlipêmicas (MIRANDA et al., 2016; NIEUWDORP et al., 2005; VAN DEN BERG et al., 2006).

1.2.4.4. O glicocálix endotelial no sistema nervoso central (SNC)

Apesar de pouco estudado no SNC, as evidências sugerem que o GE tem um papel importante na manutenção da BHE, principalmente devido à sua microarquitetura e disposição elétrica (ANDO et al., 2018).

Um estudo experimental demonstrou que a degradação do GE pode levar a uma disfunção da BHE e conseqüentemente um aumento da permeabilidade vascular, com desenvolvimento de edema em ratos submetidos artificialmente a uma parada cardiorrespiratória. Mais do que aumento do edema, a avaliação anatomopatológica do experimento demonstrou que participantes com maior perda do GE apresentaram uma ativação

maior de células da micróglia e astrócitos, além de menor volume neuronal na região hipocampal. Acredita-se, por esses achados, que o ataque ao GE é capaz de deflagrar mecanismos que comprometem a permeabilidade vascular e o transporte transcelular das células endoteliais, além de deflagrar aumento de metaloproteinases e fatores de crescimento endotelial, o que poderia comprometer a disposição das junções de oclusão, aumento a passagem indiscriminada de substâncias pela BHE (ZHU et al., 2018).

O envolvimento do GE no SNC pode ser observado também no fluxo sanguíneo cerebral (FSC), onde experimentos demonstram que a administração de enzimas deletérias ao GE de ratos, como a heparinase, causam uma transitória e marcada redução no FSC, onde, em situações de estresse e comprometimento de mecanismos compensatórios, como hipercapnia elevada, tal fenômeno pode ser mais prolongado e deletério (VOGEL et al., 2000).

Por fim, a integridade do GE também foi estudada em pacientes com AVC por infarto lacunar. Devido à presença do GE, a camada situada entre a parede vascular e a coluna de hemácias migrantes no compartimento intraluminal é composta de um número reduzido de células vermelhas, ao passo que, em situações que causam uma diminuição da espessura do glicocálix, há um aumento natural destas nesta região. Tal área é possível ser analisada por visualização com acesso sublingual usando-se um dispositivo que monitora a passagem das hemácias nos capilares em tempo real. Neste contexto, Martens e colaboradores estudaram o GE de 31 pacientes com AVC lacunar (dos quais 6 apresentavam lesões significativas de substância branca) e 19 indivíduos saudáveis, avaliando para cada, em múltiplos segmentos, a dimensão desta coluna. Aqueles pacientes com lesões extensas de substância branca, onde um dos principais mecanismos aventados para sua presença é disfunção da BHE, apresentaram um aumento na área permeável a hemácias, sugerindo menor espessura do GE (MARTENS et al., 2013).

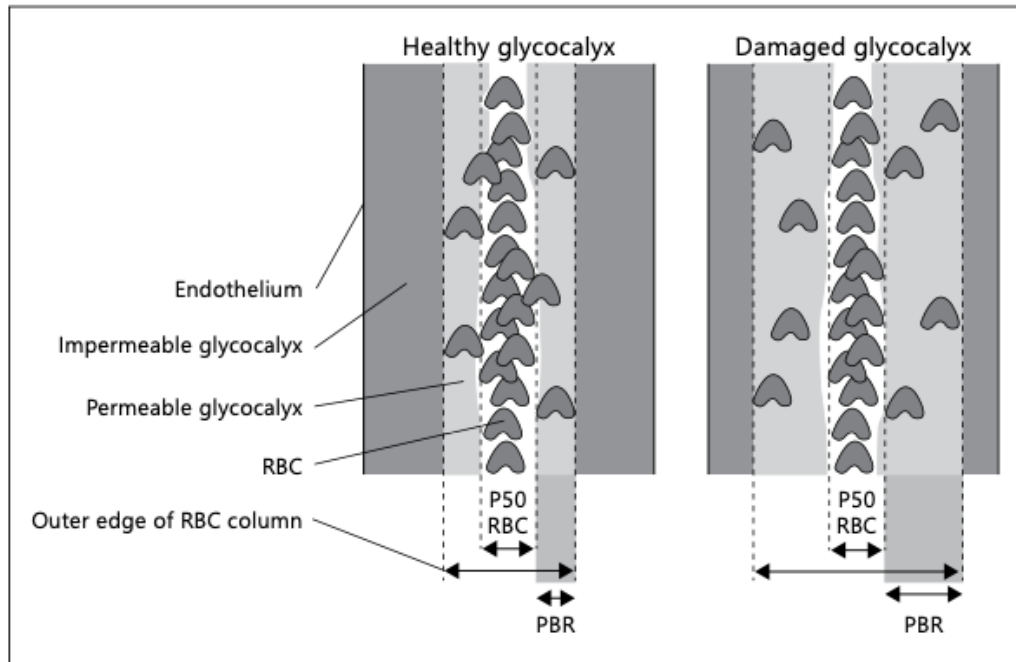


Figura 4. Desenho esquemático da passagem de hemácias no compartimento vascular em situação normal e com o glicocálix danificado (PBR com aumento de diâmetro) (adaptado de MARTENS et al., 2013).

A investigação de marcadores relacionados ao CCV em pacientes com DCPV passa, portanto, por um entendimento desta condição como, antes de tudo, uma endoteliopatia, onde uma análise minuciosa da microcirculação e seu funcionamento, mecanismos compensatórios e estruturas-chave no desempenho destas funções torna-se fundamental para o surgimento de métodos práticos de detecção da doença, um melhor entendimento de sua fisiopatogenia diferenciando-a de outras condições neurodegenerativas e o estabelecimento de potenciais alvos terapêuticos que otimizem sua prevenção e tratamento.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Principal

Avaliar os marcadores de lesão do glicocálix (sindecano-1 e hialuronano) em pacientes com CCV por DCPV em comparação a um grupo controle de indivíduos saudáveis.

2.2. Objetivos secundários

Avaliar a associação dos níveis de sindecano-1 e hialuronano com os testes psicométricos (MoCA) dos participantes do estudo.

Avaliar a associação dos níveis de sindecano-1 e hialuronano com a funcionalidade dos participantes do estudo.

Avaliar a associação dos níveis de sindecano-1 e hialuronano com o volume de hipersinal (carga lesional vascular presumida) de substância branca na RM de pacientes com CCV por DCPV.

METODOLOGIA

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo

Trata-se de estudo transversal em pacientes com diagnóstico de doença cerebral de pequenos vasos realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.2. Casuística

3.2.1. Fonte

Foram recrutados pacientes com diagnóstico de comprometimento cognitivo vascular por doença cerebral de pequenos vasos em acompanhamento no serviço de neurologia vascular da FMRP-USP, especificamente nos ambulatórios de doenças neurovasculares (ADNV) e de demências vasculares (ADVA).

Para fins de comparação, foi avaliado um segundo grupo de indivíduos saudáveis, funcionários da instituição (HCFMRP-USP), para constituição do grupo controle, selecionados previamente através de aplicação de questionário específico.

3.2.2. Elegibilidade

Foram elegíveis para o estudo os pacientes com 50 ou mais anos de idade, que consentiram com os termos propostos e que tinham diagnóstico de doença cerebral de pequenos vasos e comprometimento cognitivo vascular, definidos pela presença de:

- Infarto lacunar de etiologia associada a doença de pequenos vasos, de acordo com os critérios do ASCOD (AMARENCO et al., 2013);
- Presença de microangiopatia extensa, graduada através da escala de Fazekas (anexo F) na RM de crânio (pacientes com FAZEKAS 2 ou 3);

- Diagnóstico possível ou provável para angiopatia amilóide, de acordo com os critérios modificados de Boston (anexo G);
- Desvio de mais de um desvio-padrão (z -score $< - 1,0$) na avaliação do MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) (anexo B).

Foram excluídos pacientes que não haviam realizado RM de crânio nos últimos 24 meses, que possuíam contraindicação para a realização do exame de imagem ou que apresentavam déficit motor ou de linguagem graves impedindo comparecimento à entrevista ou aplicação do MoCA.

Além disso, pacientes com presença de infartos associados à doença de grandes artérias foram considerados inelegíveis para o estudo (lesões maiores que 20 mm não relacionadas à patologia de pequeno vaso).

3.2.3. Avaliação de dados clínicos e epidemiológicos

Os participantes do estudo foram avaliados, através de pesquisa direta ou investigação de prontuário médico, para presença de comorbidades (HAS, dislipidemia, cardiopatia, obesidade, DM), valores de creatinina, hábitos como etilismo e tabagismo e características demográficas como idade e gênero. Os dados foram identificados conforme os seguintes critérios:

- a) HAS: paciente com exame prévio de Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA) confirmando este diagnóstico; ou o uso prévio de anti-hipertensivo(s) em regime de uso contínuo pelo paciente, sob orientação médica; ou este diagnóstico foi realizado em consulta médica prévia e reportado pelo paciente ou por familiar/cuidador, mesmo que o paciente não esteja sob tratamento atual devido má adesão terapêutica;
- b) DM: paciente com glicemia da admissão hospitalar igual ou acima de 200mg/dl (exame de glicosimetria capilar também foi aceito); ou exame de hemoglobina glicosilada realizado

no HCFMRP-USP ou de outra instituição acima de 5,7%; ou uso prévio de forma contínua pelo paciente de hipoglicemiantes orais ou de insulina, sob orientação médica para tratamento de DM; ou este diagnóstico foi realizado em consulta médica prévia, com o auxílio de exame de glicemia, e reportado pelo paciente ou por familiar/cuidador, mesmo que o paciente não esteja sob tratamento atual devido má adesão terapêutica;

- c) Dislipidemia: exame de lipidograma alterado e realizado no HCFMRP-USP ou em outra instituição, seja por valores de colesterol total igual ou acima de 200mg/dl, ou de colesterol LDL igual ou acima de 120mg/dl (ZHOU et al., 2020), ou triglicérides igual ou acima de 150mg/dl; ou uso prévio pelo paciente de medicações orais hipolipemiantes, de forma contínua, sob orientação médica; ou este diagnóstico foi realizado em consulta médica prévia, com o auxílio de exame de lipidograma, e reportado pelo paciente ou por familiar/cuidador, mesmo que o paciente não esteja sob tratamento atual devido má adesão terapêutica;
- d) Obesidade: Índice de massa corpórea maior ou igual a 30 kg/m²;
- e) Cardiopatia: presença de lesão cardíaca possivelmente ou provavelmente associada a evento cerebrovascular, conforme estratificado e definido pela classificação de ASCOD como C1 ou C2 (AMARENCO et al., 2013);
- f) Tabagismo: paciente em uso atual de tabaco, seja sob a forma inalada ou via oral, independente da carga tabágica, e hábito regular informado pelo paciente ou por familiar/cuidador;
- g) Etilismo: paciente em uso atual de bebidas alcólicas, em todas suas preparações, independente da dose semanal ou frequência relatadas, e hábito etílico regular informado pelo paciente ou por familiar/cuidador.

3.2.4. Avaliação cognitiva

Os pacientes foram avaliados através do questionário MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) (anexo B). Os indivíduos do grupo controle receberam contato telefônico para aplicação do T-MoCA (anexo H), versão do MoCA validada para rastreamento de déficit cognitivo via telefone.

3.2.5. Avaliação de funcionalidade

Os participantes do estudo tiveram sua funcionalidade avaliada através da soma dos escores obtidos através da aplicação dos questionários de atividade básica e instrumental de vida diária, de Katz e Lawton.

3.2.6. Protocolo de neuroimagem

Todos os exames foram realizados em aparelho de RM Philips Achieva de campo de 3 Tesla. Imagens em T1 e T2 consistiram em sequências *spin echo*, com os respectivos tempos de eco e tempo de repetição: 10 e 580 milissegundos nas imagens T1; e 80 e 5527 milissegundos nas imagens T2. Ambas as sequências foram adquiridas em cortes de 5 milímetros. Imagens em FLAIR do protocolo habitual foram adquiridas com tempos de eco de 120 milissegundos, de repetição de 11000 milissegundos, e de inversão de 2800 milissegundos, em cortes de 4 milímetros. Foram realizadas sequências de SWI e gradiente *echo*, além de difusão e mapa de AVC, conforme protocolo institucional.

3.2.7. Protocolo de segmentação de lesões de substância branca na RM

As lesões de substância branca, representadas por hipersinal na sequência FLAIR da RM de crânio, foram segmentadas utilizando-se o algoritmo LPA (*lesion prediction algorithm*), implementado na caixa de ferramentas *Lesion Segmentation Tool (LST)*, *version 3.0.0*.

(www.statistical-modelling.de/lst.html) for *Statistical Parametric Mapping 12 (SPM 12)*, seguindo-se inspeção visual da qualidade da segmentação. Previamente, cerca de 40 indivíduos foram avaliados para definição de um ponto de corte usada na detecção de probabilidade de lesão, sendo definido um corte de 0,5 baseado no rendimento do algoritmo em comparação à inspeção visual minuciosa de um examinador nas sequências de FLAIR. Para fins de normalização, o valor final considerado foi derivado do quociente entre volume total da carga lesional (hipersinal da substância branca representando microangiopatias) e volume craniano total (VCT), multiplicado então por 100 e apresentado em unidades de porcentagem do VCT.

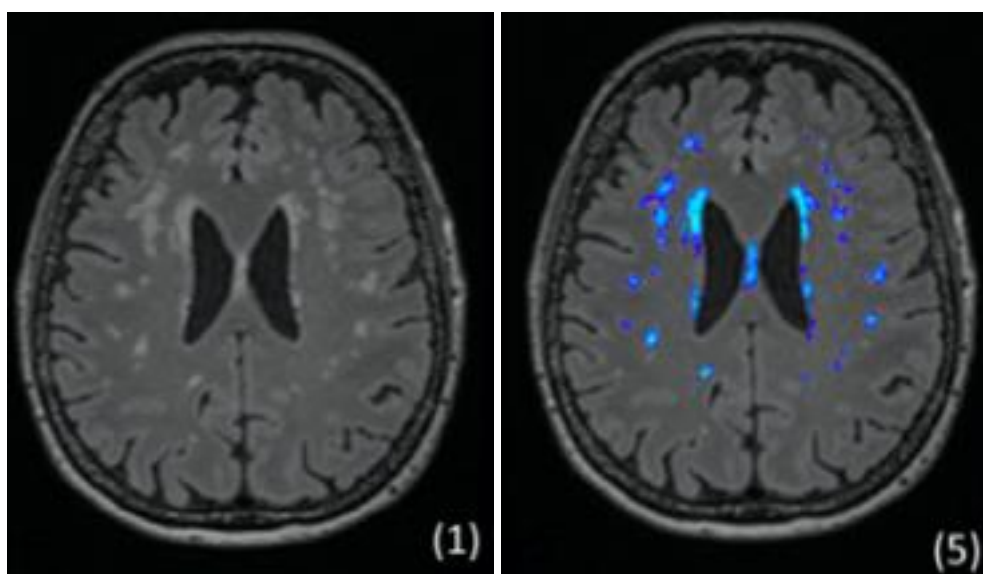


Figura 5. Exemplo de segmentação de hipersinal de substância branca de origem vascular presumida através de método automatizado, LPA (adaptado de FREY et al., 2019).

3.2.8. Coleta do material (biomarcadores)

As coletas de amostras sanguíneas foram realizadas em tubo sem conservantes no momento da avaliação cognitiva. Após a formação do coágulo, o tubo foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos e o soro foi coletado e armazenado em freezer a -70° Celsius. As amostras

foram então encaminhadas para análise dos marcadores de lesão do glicocálix. Foram dosados os seguintes biomarcadores:

a) **Dosagem de sindecano-1 (human syndecan-1 CD138)**

A dosagem de sindecano-1 foi realizada por técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) através dos Kits comerciais disponíveis no mercado (R&D, Minneapolis, USA). O ensaio foi linear, de 8-256 ng/ml, e amostras acima desta concentração foram diluídas.

b) **Dosagem de hialuronano (hyaluron)**

A dosagem de hialuronano foi realizada por técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) através dos Kits comerciais disponíveis no mercado (R&D, Minneapolis, USA). O ensaio foi linear, de 0,370 a 90 ng/ml, e amostras acima desta concentração foram diluídas.

3.2.9. Aspectos Éticos

O estudo foi composto por indivíduos humanos, adultos, de ambos os sexos, que concordaram em participar dele. Foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki de princípios éticos para pesquisa em seres humanos.

O trabalho foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP com CAAE: 09825019.2.0000.5440 (anexo A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado segundo a resolução nº196 de agosto de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, foi lido e explicado ao paciente, sendo que, uma vez dado o aceite para participação da pesquisa, o termo foi assinado em duas vias idênticas - uma entregue ao paciente e outra que ficou com o pesquisador responsável. Todas as informações coletadas foram mantidas em sigilo. Futuramente, os dados coletados poderão ser publicados em revistas

científicas e apresentados em congressos, porém, sem a divulgação dos nomes dos participantes.

3.2.10. Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas por meio de frequência absoluta e relativa para as variáveis qualitativas. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio-padrão para variáveis com distribuição normal e mediana e intervalo interquartil para variáveis com distribuição anormal. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação de normalidade. As variáveis basais entre os grupos foram avaliadas através do teste exato de Fisher e qui-quadrado para variáveis categóricas, teste T de student para variáveis numéricas com distribuição normal e teste de *Mann-Whitney* para variáveis numéricas com distribuição não normal (teste não-paramétrico).

Inicialmente, foram avaliadas entre os dois grupos cada variável basal, quais sejam: idade, gênero, HAS, DM, dislipidemia, tabagismo, etilismo, presença de cardiopatia, obesidade, creatinina, funcionalidade (medida através da soma dos pontos nas escalas de Katz e Lawton, respectivamente) e níveis de Sindecano e Hialuronano. Posteriormente, aquelas variáveis com nível de significância menor que 1,0 na análise univariada foram selecionadas para realização de uma análise de regressão logística multivariada a fim de se detectar fatores independentes para o desfecho clínico em questão (CCV por DCPV), onde o melhor modelo foi selecionado através do método *stepwise forward*. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ (bicaudal) para todas as análises.

A partir da regressão logística binária, foi usada estatística-C para avaliação da acurácia do sindecano para a presença de CCV, a partir de análise de curva ROC e identificação de ponto-ótimo pelo índice de Youden.

Por fim, foram aplicados testes de correlação pelo método de Spearman para investigar a correlação entre os níveis dos biomarcadores e resultados dos testes psicométricos (MoCA), escore de funcionalidade e carga lesional de hipersinal na substância branca, identificada através de segmentação das lesões de substância branca nos estudos de RM de crânio.

Foram utilizados para a realização destas análises o pacote estatístico da IBPM SPSS, versão 28 e o R *software*, versão 4.0.4.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Durante o período de inclusão dos pacientes, julho de 2019 a março de 2020, foram avaliados 47 potenciais candidatos ao estudo, dos quais 25 foram considerados inelegíveis para o estudo: 8 devido à presença de lesão de grande artéria após revisão das imagens; 1 não consentiu participação; 2 não compareceram à entrevista; 1 não possuía RM recente após revisão dos dados; 7 apresentavam déficit motor ou de linguagem graves impedindo comparecimento à entrevista ou aplicação do MoCA; 1 não apresentava lesões vasculares significativas após revisão de imagem e, por fim, 5 apresentavam DCPV porém sem CCV. O fluxograma do estudo, bem como o registro do rastreio de potenciais candidatos encontram-se abaixo:

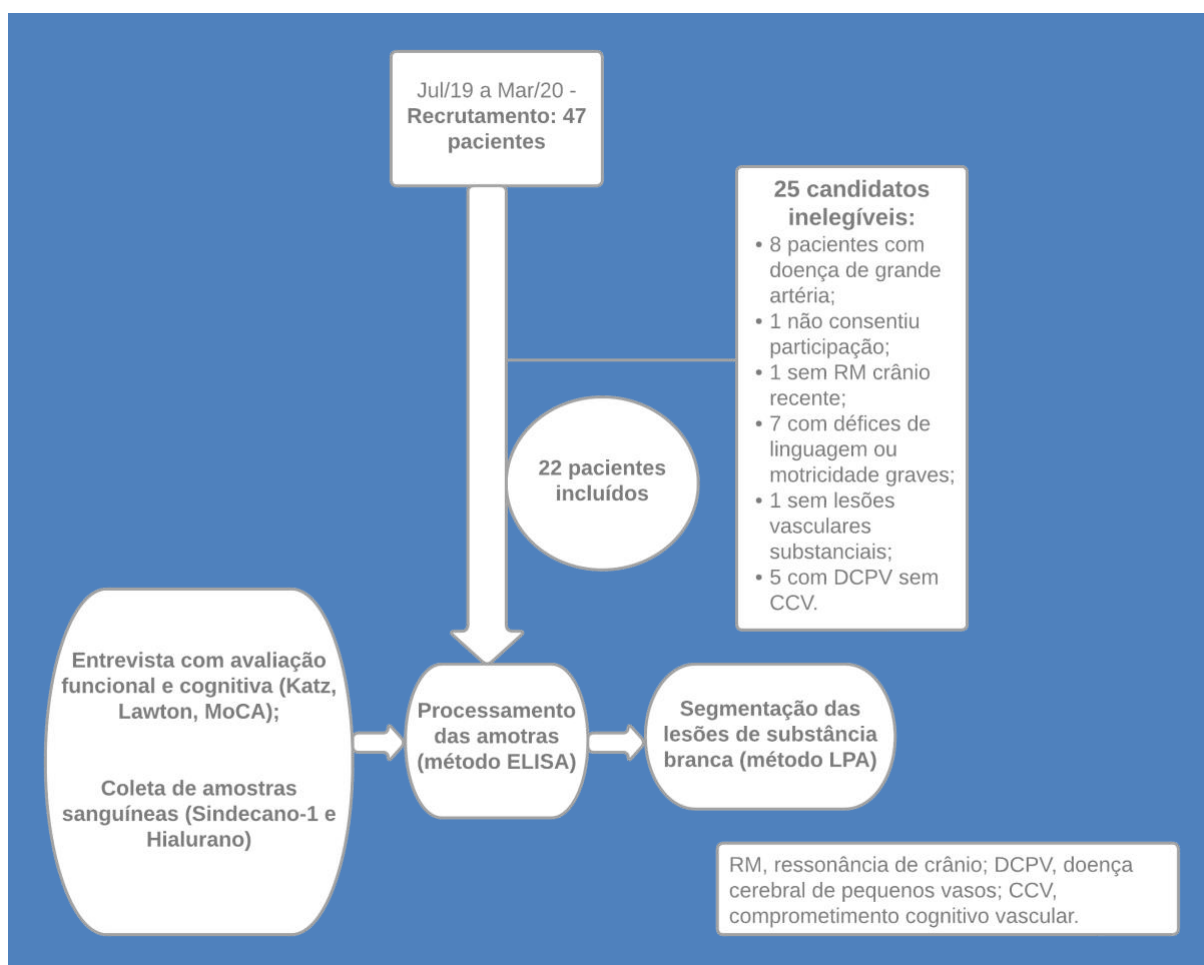


Figura 6. Fluxograma do estudo e registro do rastreio dos potenciais candidatos.

4.1. Características demográficas e clínicas

Os pacientes do grupo de CCV apresentaram uma média de idade de 64,8 anos (desvio-padrão de 13,8) em comparação a 39,6 anos (desvio-padrão de 7,21) do grupo controle, constituindo uma diferença significativa entre ambos ($p < 0,01$). Pacientes do grupo com CCV apresentaram maiores índices de HAS (77,3% x 18,2%, $p < 0,01$), DM (27,3% x 0%, $p = 0,02$), além de menores índices de funcionalidade, quando avaliada a soma dos escores das escalas de Lawton e Katz (5,3 x 0, $p < 0,01$). Além disso, houve uma tendência para maior incidência de cardiopatia no grupo de sujeitos (27,2% x 4,5%, $p = 0,09$).

Não houve diferença estatisticamente significativa no gênero e incidências de dislipidemia, tabagismo, etilismo e obesidade entre os grupos.

4.2. Achados laboratoriais

Não houve diferença estatística entre os níveis de creatinina entre ambos os grupos (1,1 x 1,0, $p = 0,36$). Níveis de hialuronano mostraram uma tendência para maiores níveis nos grupos dos controles, ainda que sem diferença estatística (mediana de 4,8 x mediana de 6,0, $p = 0,05$).

Níveis marcadamente maiores de sindecano-1 foram observados nos grupos dos pacientes com CCV (78,4 ng/ml x 24 ng/ml, $p < 0,01$). Os resultados estão sumarizados abaixo:

Tabela 1. Características clínico-demográficas e laboratoriais da população estudada.

	CCV (n = 22)	Controle (n = 22)	p valor
Idade (média, \pm DP)	64,8 (\pm 13,8)	39,6 (\pm 7,21)	< 0,01
Gênero masculino (%)	15 (68,2)	13 (59,1)	0,75
HAS (%)	17 (77,3)	4 (18,2)	< 0,01
DM (%)	6 (27,3)	0 (0)	0,02
Dislipidemia (%)	13 (59,1)	8 (36,4)	0,22
Tabagismo (%)	5 (22,7)	2 (9,1)	0,41
Etilismo (%)	4 (18,2)	1 (4,5)	0,34
Cardiopatia (%)	6 (27,3)	1 (4,5)	0,09
Obesidade (%)	6 (27,3)	3 (13,6)	0,45
Creatinina (mediana, IIQ)	1,1 (0,8 - 1,4)	1,0 (0,7 - 1,1)	0,36
Funcionalidade* (média, \pm DP)	5,3 (\pm 5,0)	0 (\pm 0)	< 0,01
Sindecano (mediana, IIQ)	78,4 (41,1 - 100)	24 (16 - 49,5)	< 0,01
Hialuronano (mediana, IIQ)	4,8 (2,0 - 5,7)	6,0 (4,0 - 36,5)	0,05

CCV, comprometimento cognitivo vascular; DP, desvio-padrão; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes mellitus; IIQ, intervalo interquartil.

4.3. Avaliação da relação dos biomarcadores com CCV

Diante dos achados na análise univariada presentes na tabela 1, construímos um modelo de regressão logística com desfecho binário para presença de CCV por DCPV ajustado para as variáveis com $P < 0,1$ (Idade, HAS, DM, Cardiopatia, funcionalidade e Hialuronano). Através de método de seleção *stepwise forward*, apenas duas variáveis foram identificadas como sendo fatores independentes para a presença de CCV (Sindecano-1 e Idade) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise multivariada (regressão logística) para presença de CCV por DCPV.

Variável	OR	IC 95%	p-valor
Sindecano-1	1,08	1,01 - 1,15	0,01
Idade	1,35	1,04 - 1,76	0,02

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; CCV, comprometimento cognitivo vascular

HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes mellitus.

* Análise ajustada para presença de HAS, DM, Cardiopatia, Funcionalidade e Hialuronano.

4.4. Avaliação da acurácia do Sindecano-1 na identificação de CCV por DCVP

Através de estatística-C, avaliamos os níveis de sensibilidade e especificidade do biomarcador na identificação de CCV por DCPV. Com área sob a curva de 0,78 (0,64 – 0,92), o sindecano-1 se mostrou um marcador útil na identificação de presença de CCV, com o ponto-ótimo de corte de 24,2 ng/ml demonstrando uma sensibilidade e uma especificidade de, respectivamente, 86% e 63% (Figuras 6 e 7).

Curva ROC: Sindecano e Comprometimento Cognitivo Vascular

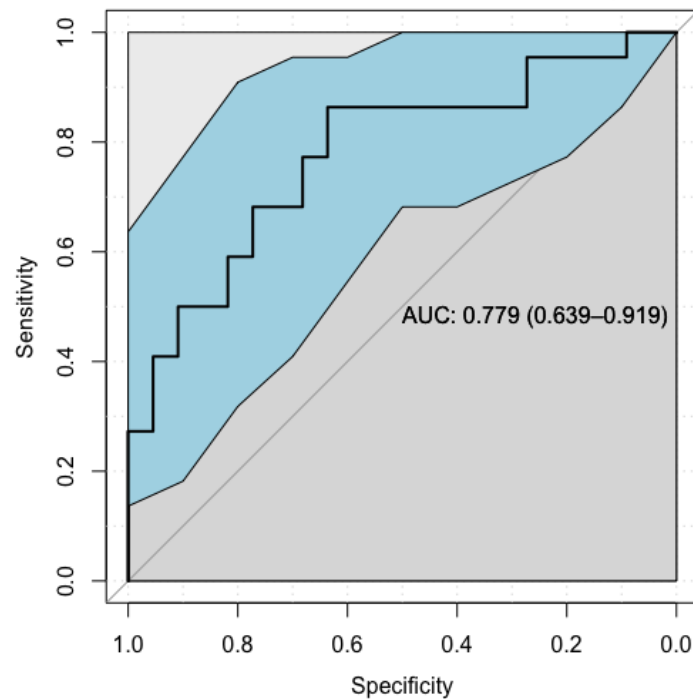


Figura 7. Análise de curva ROC envolvendo o Sindecano-1 e a presença de comprometimento cognitivo vascular.

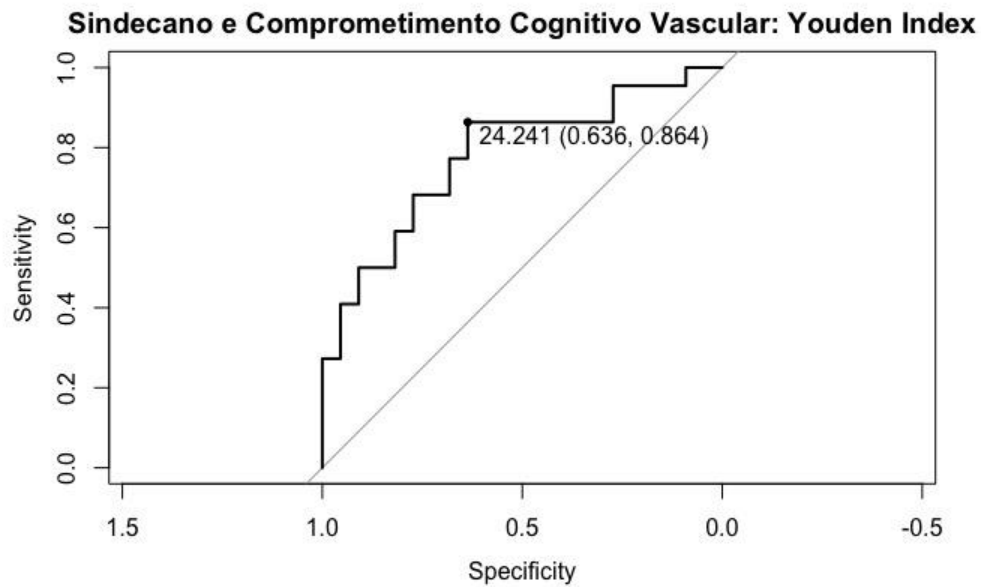


Figura 8. Estatística-C com identificação de ponto-ótimo na curva para determinação de sensibilidade e especificidade do sindecano-1 para presença de comprometimento cognitivo vascular.

4.5. Associação entre níveis de sindecano-1 e hialuronano e os resultados do MoCA

Os níveis de sindecano-1 demonstraram uma modesta correlação com o escore obtido no MoCA (coeficiente de correlação, ρ , - 0,34, $p = 0,02$), conforme abaixo:

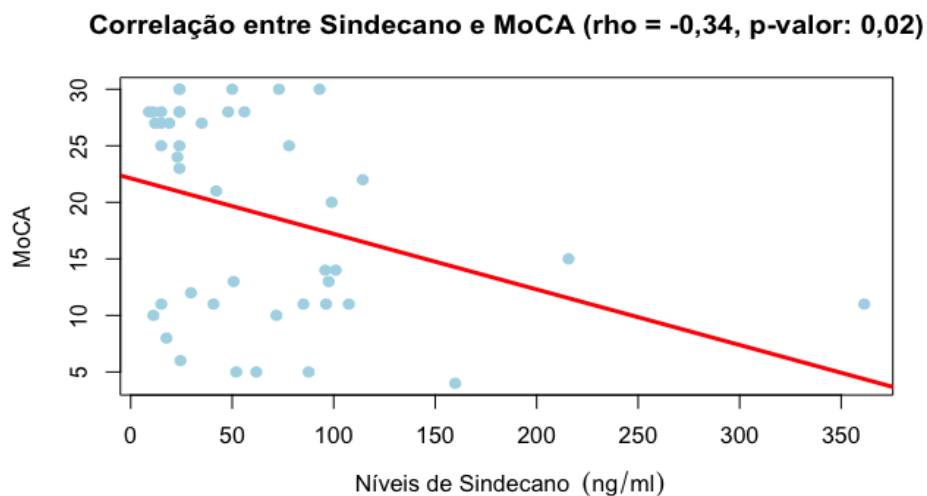


Figura 9. Correlação (Spearman) entre níveis de Sindecano-1 e escores do MoCA.

Os níveis de hialuronano, por sua vez, não se correlacionaram com o teste psicométrico do MoCA (coeficiente de correlação, rho, de 0,17, $p = 0,26$).

4.6. Associação entre níveis de sindecano-1, hialuronano e a funcionalidade

Não houve associação entre os biomarcadores em questão e a funcionalidade pacientes, conforme tabela abaixo:

Variável	Coeficiente de correlação(rho)	p - valor
Funcionalidade		
Sindecano-1	0,26	0,96
Hialuronano	-0,13	0,19

Tabela 3. Testes de correlação (Spearman) entre biomarcadores e funcionalidade.

4.7. Associação entre volume de hipersinal de substância branca e níveis de sindecano-1 e hialuronano.

Foram avaliados o volume de carga lesional de origem vascular presumida e o número de lesões presentes em cada RM de crânio. Tais valores foram submetidos a testes de correlação com os valores dos biomarcadores séricos, não sendo encontrados valores significativos, conforme abaixo:

Variáveis	Coeficiente de correlação(rho)	p - valor
Volume total de carga lesional		
Sindecano-1	0,31	0,18
Hialuronano	-0,1	0,68
Número de lesões de substância branca		
Sindecano-1	-0,13	0,57
Hialuronano	0,15	0,51

Tabela 4. Testes de correlação entre volume de carga lesional, número de lesões de substância branca e os biomarcadores.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar da grande prevalência, sendo a segunda causa mais comum de demência no mundo, a DVa ainda carece de um melhor entendimento de seus fatores fisiopatogênicos, da sua relação com outras doenças neurodegenerativas (principalmente a DA) e de métodos úteis que corroborem o seu diagnóstico precoce. O uso de biomarcadores, neste contexto, parece ser uma alternativa interessante, uma vez que, quando aplicados de maneira racional, podem suscitar modelos patogênicos explicativos, métodos de complementação diagnóstica e, idealmente, alvos terapêuticos capazes de mudar o curso natural da doença. De fato, em encontro realizado pela *Alzheimer's Association* em 2014, onde o foco principal foi a discussão sobre a relação entre patologias vasculares e outras doenças neurodegenerativas, o desenvolvimento de biomarcadores foi considerado uma prioridade de pesquisa (SNYDER et al., 2015).

A DCPV, por sua vez, ocupa a primeira causa de DVa e é caracterizada por uma série de marcadores cujos mecanismos envolvidos em suas origens e a dinâmica entre eles, principalmente no que diz respeito ao comportamento temporal dessas lesões e como estas se inter-relacionam, estabelecem um interessante espectro de alterações que muito vão além dos processos já mais conhecidos, como isquemia, lipohialinólise e necrose fibrinóide (SHI; WARDLAW, 2016). Cada vez mais, tem-se reconhecido o papel da microcirculação e seus mecanismos autorregulatórios neste processo, onde a liberação de citocinas inflamatórias e metaloproteinases acabam por danificar a matriz extracelular do endotélio, comprometendo estruturas como o GE e, por fim, impactando processos de manutenção da reologia local, propriedades mecanotransdutoras, e danificando mecânica própria da barreira endotelial, de maneira que tais acontecimentos levam a um aumento de permeabilidade vascular, com aumento de adesividade de leucócitos e células inflamatórias e, por fim, com o estabelecimento

de um mecanismo pernicioso da falha da BHE e perpetuação de edema tecidual (NIAN et al., 2020).

Investigar marcadores de lesão do GE neste contexto significa explorar este modelo, onde a lesão do GE levaria a um descolamento e dispersão de estruturas como o sindecano-1 e o hialuronano no plasma, possibilitando suas dosagens séricas. Em última análise, significaria identificar indivíduos cuja microcirculação encontra-se mais vulnerável e menos resiliente a agressões por meio de agentes inflamatórios e radicais livres.

No presente estudo, identificamos um aumento dos níveis plasmáticos de sindecano-1 em pacientes com CCV por DCPV, sugerindo que estes apresentam um aumento na vulnerabilidade dos mecanismos de defesa e manutenção do GE, levando a um mau funcionamento do papel que o GE exerce na unidade neurovascular e culminando em uma disfunção microcirculatória, mecanismo-chave para o desencadeamento de processos patogênicos envolvendo a DCPV. Tais achados reforçam a importância de estruturas como o GE na reologia de pequenas artérias, veias e capilares e ressaltam a implicação clínica que o desarranjo dessa estrutura pode causar ao CCV, originalmente exposta nestes achados.

5.1. Particularidades do glicocálix cerebral: a última barreira da microcirculação?

Em estudo realizado por Ando e colaboradores (2018), capilares cerebrais, pulmonares e cardíacos de ratos foram fixados com nitrato de lantânio e estudados via microscopia eletrônica. À avaliação ultraestrutural, detectou-se que o GE cerebral era responsável pela cobertura de cerca de 40% do capilar, enquanto a cobertura para capilares cardíacos e pulmonares eram, respectivamente, de 15% e 3,7%. Posteriormente, mesmo após uma programada lesão vascular induzida por lipopolissacarídeos, houve uma persistência de quantidades substanciais de GE no capilar cerebral, ao passo que os demais capilares permaneceram praticamente desprovidos desta estrutura (ANDO et al., 2018). Tais achados

colocam o GE cerebral como uma barreira mais densa e resiliente em relação aos GE de outros sistemas, o que sugere a importância desta estrutura como um agente importante na proteção da microcirculação e bom funcionamento da BHE. Por outro lado, é possível depreender que, ao tratar-se de um processo sistêmico, a lesão de sua estrutura mais robusta pode sinalizar uma injúria difusa e severa da microcirculação em outros. Neste sentido, a análise do GE cerebral pode servir não só como um marcador de saúde da circulação cerebral, porém da microcirculação como um todo.

5.2. Sindecano-1 como marcador de CCV por DCPV: um achado inédito?

Esse é o primeiro estudo, ao que nos consta, que demonstrou o sindecano-1, proteoglicano importante ligado à superfície do GE, como um marcador independente de CCV por DCPV.

O sindecano-1 é responsável por uma série de atividades que envolvem o comportamento celular a nível endotelial, promovendo processos de adesão, motilidade, invasão e sinalização intracelular. Além disso, age como receptor de fatores de crescimento e como co-receptor das integrinas, uma família de glicoproteínas constituintes do GE e importantes na manutenção de permeabilidade vascular (CAREY, 1997; GÖTTE; ECHTERMAYER, 2003; TENG; AQUINO; PARK, 2012).

A degradação e liberação desse marcador no plasma se dá prioritariamente pela ação de MMPs, enzimas de matriz associadas à quebra de BHE e entrada de proteínas pró-inflamatórias no sistema nervoso central (BECKER et al., 2015). Modelos experimentais demonstraram que, em cenários de isquemia, mesmo após restabelecimento do fluxo sanguíneo e do suporte nutricional à área de penumbra, fatores inflamatórios tem um papel fundamental na disfunção da BHE e progressão sustentada do edema cerebral, desencadeada inicialmente por metaloproteinases de membrana e MMP-2, substâncias envolvidas justamente na lesão do EG e dispersão do sindecano-1 plasmático. Com o aumento da adesividade leucocitária, liberação

de fatores de necrose tumoral, interleucina-1 e infiltração neutrofílica, vai havendo um aumento na formação do infarto tecidual, bem como aumento na ação das MMP 3 e 9 (YANG; ROSENBERG, 2015).

5.2.1. Acurácia do sindecano-1 na detecção de CCV

Nossos resultados demonstraram uma boa acurácia deste biomarcador na identificação da presença de CCV, com uma área sob a curva de 0.78 (0,64 – 0,92). É de se notar, no entanto, os baixos valores de sindecano-1 em nossos pacientes em relação aos estudos observados na literatura para outras condições. O grupo de pacientes com CCV apresentou mediana de 78,4 ng/ml contra 24 ng/ml dos controles. Já em estudo realizado por Rahbar e colaboradores (2015), pacientes com politrauma grave demonstraram níveis de sindecano-1 em torno de 245,8 ng/ml em comparação a 31,6 ng/ml dos pacientes controle (RAHBAR et al., 2015). Em estudo realizado por Dimple Anand e colaboradores (2016), foi detectado um ponto-de-corte de 898 ng/ml para definição de mortalidade em pacientes com sepse (ANAND et al., 2016). Acreditamos que tal diferença se dê pela condição estudada, uma vez que, no presente estudo, avaliamos pacientes ambulatoriais, fora da fase aguda do AVC e com quadro de demência, uma doença crônica.

5.3. Análise do desempenho do hialuronano como marcador de CCV por DCPV

Não houve diferença entre os níveis de hialuronano quando comparados sujeitos e controles. Houve uma discreta diferença, porém uma tendência, para maiores níveis nos controles. Neste caso, é preciso levar em consideração a dinâmica desses marcadores e a patologia estudada. Provavelmente, pelo fato de estarem em constante processo de renovação e apresentarem uma multiplicidade de combinações arquiteturais, determinadas através de processos de sulfatação e diferentes rearranjos (REITSMA et al., 2007), esses biomarcadores

podem apresentar comportamentos bastante heterogêneos, sendo seus resultados dependentes de fatores como a condição estudada, o momento em que foi realizada a coleta, a fase de atividade de determinada patologia e o método de avaliação. Em estudo realizado por DellaValle e colaboradores (2019), os pesquisadores avaliaram 11 marcadores diferentes do GE de forma sequencial em três momentos temporais distintos (nas primeiras 72h, no sétimo dia e no 90º dia) em relação ao evento-index de AVC isquêmico, com nenhuma proteoglicana, com exceção do CD44 e do sindecano-3, tendo se elevado ao longo desse período em comparação a indivíduos controles. No grupo das glicosaminoglicanas, apenas o hialuronano não se alterou de forma significativa em relação ao grupo controle (DELLAVALLE et al., 2019). Todos retornaram aos níveis basais em até 90 dias, o que sugere que tais marcadores apresentam oscilações significativas em relação ao tempo e conseqüentemente em relação ao modo de injúria (agudo x crônico) da condição investigada. Desta feita, a análise morfológica, direta ou indireta, da espessura do glicocálix em detrimento de dosagens de biomarcadores talvez seja a melhor alternativa na investigação das mais variadas patologias, principalmente crônicas.

Além disso, é preciso destacar certas particularidades do hialuronano. Diferentemente do sindecano-1, o mecanismo de ligação dessa substância à célula endotelial ainda é motivo de controvérsia. Acredita-se que possa estar ligado ao receptor CD44 ou ligado a enzimas que a produzem (hialuronano sintases), presentes no lado citosólico da membrana. Outra possibilidade é que o hialuronano não esteja sequer ligado diretamente à membrana endotelial (HASCALL; WEIGEL; TOOLE, 2016; NANDI; ESTESS; SIEGELMAN, 2000; WEIGEL; HASCALL; TAMMI, 1997). Soma-se a isso o fato das glicosaminoglicanas serem liberadas no plasma antes mesmo das proteoglicanas, o que pode sugerir que, haja vista sua liberação precoce, este não seja o marcador ideal para avaliação de patologias de apresentação crônica (DELLAVALLE et al., 2018).

5.4. Associação dos biomarcadores com o MoCA

Em consonância com a relação do sindecano-1 sendo variável independente associada ao CCV por DCPV, era esperada uma relação desse marcador com os testes do MoCA. Todavia, a correlação do sindecano-1 com os resultados do MoCA foi apenas modesta, o que, em parte, pode ser justificada pelo fato de termos utilizado valores absolutos e não z-escores padronizados para escolaridade e idade. Tal limitação pode ter comprometido o grau de correlação entre ambas as variáveis.

5.5. Associação dos biomarcadores com o grau de funcionalidade

Não houve correlação dos valores de sindecano-1 ou hialuronano com os graus de funcionalidade dos participantes do estudo. Acreditamos que a ausência desse achado possa estar associada ao fato de que, uma vez tratando-se de pacientes com DCV, a perda da funcionalidade pode não ser exclusivamente relacionada ao déficit cognitivo, onde pacientes com cargas lesionais menores, porém com lesões em áreas estratégicas - como a via motora - podem apresentar certo grau de incapacidade sem necessariamente apresentarem altos níveis de carga lesional associadas a aumento de sindecano-1.

5.6. Hipersinal de substância branca de etiologia vascular presumida: sem associação com os biomarcadores

O surgimento de hiperintensidades na substância branca é muito comum em idosos, estando presente em até dois terços dos pacientes acima de 75 anos (WOLFSON et al., 2013). Usualmente são bilaterais, simétricas, envolvendo principalmente as regiões periventriculares e, eventualmente, podem acometer tronco encefálico e até partes de substância cinzenta. De etiologia ainda imprecisa, estudos patológicos têm demonstrado perda de oligodendrócitos e

dano axonal nas áreas mais afetadas, com técnicas multimodais de ressonância sendo úteis no mapeamento e estratificação de severidade dessas lesões, demonstrando, na verdade, um cenário heterogêneo, envolvendo estágios diferentes de acometimento, com sinais de comprometimento inclusive da substância branca aparentemente normal e remota às lesões mais acentuadas (MADDEN et al., 2012; MANIEGA et al., 2015; SHI; WARDLAW, 2016).

Vários estudos têm versado sobre os mecanismos envolvidos no surgimento e na progressão dessas alterações ao longo do tempo. A irrigação dessas áreas por arteríolas terminais com limitado fluxo colateral e baixa densidade microvascular tornam a substância branca subcortical particularmente susceptível a fenômenos de hipofluxo, o que corrobora a hipótese de um estado crônico de hipoperfusão e de “infartos incompletos”, como denominado por Brun em 1986 (BRUN; ENGLUND, 1986; CIPOLLA, 2009; IADECOLA, 2013; PETERSON; WANG; BRITZ, 2011). No entanto, um estudo longitudinal realizado em 2015 demonstrou que o volume de alterações na substância branca e sua progressão ao longo do tempo são preditores mais fidedignos de déficit perfusional do que o seu inverso (VAN DER VEEN et al., 2015). Além disso, estudos *post-mortem* tem demonstrado a presença de venulopatia em regiões periventriculares, onde, supostamente, estariam associadas à edema vasogênico e déficit de drenagem de fluidos intersticiais, bem como sinais de quebra de BHE, permitindo o vazamento de componentes do plasma e células capazes de desencadear um processo inflamatório perivascular com desmielinização e gliose (BLACK; GAO; BILBAO, 2009; FEIGIN; POPOFF, 1963; MANIEGA et al., 2015).

Esse fenômeno de aumento da permeabilidade vascular e comprometimento de drenagem do fluido intersticial parece estar, em teoria, diretamente ligado à disfunção do GE, uma vez que sua deterioração pode comprometer o estabelecimento de uma barreira mecânica e elétrica (negativamente carregada) e desregular a mediação, seja por quimiorreceptores, seja por extensão da própria camada, entre células sanguíneas, moléculas de adesividade endotelial e

citocinas inflamatórias. O estudo de Martens e colaboradores (2013) já havia demonstrado relação entre a presença de lesões de substância branca e redução do calibre do GE através de análise da microcirculatura sublingual de pacientes com AVCi lacunar e participantes saudáveis. Apenas pacientes com AVCi lacunar e amplas áreas de hipersinal de substância branca apresentaram comprometimento do GE.

Desta maneira, através de segmentação automatizada das máscaras de lesão de substância branca, representadas por hipersinal na sequência FLAIR da RM de crânio, foram medidos o número de lesões e seu volume agregado, os quais não demonstraram correlação com os biomarcadores do estudo. O tamanho da amostra, mas principalmente a ausência de análise da RM de crânio dos pacientes do grupo controle, podem ter comprometido esse resultado.

5.7. Limitações do estudo

Trata-se de um estudo transversal, o que comprometeu a análise longitudinal da evolução do declínio cognitivo dos participantes e do comportamento desses marcadores ao longo do tempo.

O tamanho reduzido da amostra, por sua vez, impediu análises mais específicas da relação entre o aumento do sindecano-1 e o comprometimento de subáreas da cognição, limitando-nos ao uso de uma ferramenta de rastreio, como o MoCA. Tal situação, no entanto, não implicou prejuízo na identidade principal da pesquisa: seu caráter exploratório e gerador de hipóteses.

A ausência de padronização através de desvios-padrão do grupo controle para fins de comparação e análise de correlação entre o MoCA e os biomarcadores provavelmente atenuou o grau de correlação entre estes.

A ausência de RM de crânio dos participantes do grupo controle para fins de análise e segmentação de eventuais lesões de substância branca comprometeu uma análise mais robusta da relação entre hipersinal de substância branca e aumento nos valores do sindecano-1.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

O sindecano-1, ao contrário do hialuronano, mostrou-se um potencial marcador de CCV em pacientes com DCPV.

Os níveis de sindecano-1 mostraram associação com os escores obtidos em avaliação psicométrica em pacientes com CCV por DCPV. Os níveis de hialuronano não obtiveram correlação com esses achados.

Não foi possível estabelecer relação dos níveis dos biomarcadores em relação à funcionalidade dos pacientes.

Não houve correlação entre o número de lesões de substância branca (presumidamente vasculares) e seu volume agregado com os níveis de sindecano-1 e hialuronano.

6.1. Perspectivas futuras

Avaliar de maneira longitudinal o desempenho cognitivo e o comportamento estrutural do GE através de análise direta da vasculatura sublingual desses pacientes.

Estabelecer um grupo controle com RM de crânio a fim de correlacionar não somente o desempenho cognitivo, mas os mais variados achados radiológicos da DCPV com achados de degradação do GE.

Desenvolver um painel de coleta de marcadores de lesão endotelial para fins de pesquisa e investigação de novos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMARENCO, P. et al. **The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping) Cerebrovascular Diseases** Cerebrovasc Dis, , 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23899749/>>. Acesso em: 29 jun. 2022
- American Psychiatric Association. 2014.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1. **Psychiatry.org - DSM**. Disponível em: <<https://psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>>. Acesso em: 16 jun. 2022.
- ANAND, D. et al. Evolution of serum hyaluronan and syndecan levels in prognosis of sepsis patients. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 10–11, p. 768–776, 1 jul. 2016.
- ANDO, Y. et al. Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- ANDRESEN, J.; SHAFI, N. I.; BRYAN, R. M. Endothelial influences on cerebrovascular tone. [s.d.].
- BECKER, B. F. et al. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. **British journal of clinical pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 389–402, 1 set. 2015.
- BLACK, S.; GAO, F.; BILBAO, J. Understanding White Matter Disease: Imaging-Pathological Correlations in Vascular Cognitive Impairment. **Stroke**, v. 40, n. 3, Supplement 1, p. S48–S52, 1 mar. 2009.
- BLASS, J. P.; HOYER, S.; NITSCH, R. A Translation of Otto Binswanger’s Article, ‘The Delineation of the Generalized Progressive Paralyzes’. **Archives of Neurology**, v. 48, n. 9, p. 961–972, 1991.
- BOULOS, M. I. et al. Acute stroke syndromes caused by small vessel disease. **Cerebral Small Vessel Disease**, p. 217–235, 2011.
- BRUN, A.; ENGLUND, E. A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: A pathoanatomical study. **Annals of Neurology**, v. 19, n. 3, p. 253–262, mar. 1986.

CAPLAN, L. R. **Binswanger's disease - Revisited** *Neurology*, , 1995. Disponível

em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7723946/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

CAREY, D. J. **Syndecans: Multifunctional cell-surface co-receptors** *Biochemical*

Journal *Biochem J*, , 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9355727/>>.

Acesso em: 16 jun. 2022

CHEN, Y. D. et al. Efficacy of cholinesterase inhibitors in vascular dementia: An updated meta-analysis. **European Neurology**, v. 75, n. 3–4, p. 132–141, 1 abr. 2016.

CIPOLLA, M. J. **The Cerebral Circulation**. [s.l.] Morgan & Claypool Life Sciences, 2009.

DEBETTE, S. et al. Association of MRI markers of vascular brain injury with incident stroke, mild cognitive impairment, dementia, and mortality: The framingham offspring study.

Stroke, v. 41, n. 4, p. 600–606, abr. 2010.

DELLAVALLE, B. et al. Detection of glycan shedding in the blood: New class of multiple sclerosis biomarkers? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1254, 4 jun. 2018.

DELLAVALLE, B. et al. Multiple soluble components of the glycocalyx are increased in patient plasma after ischemic stroke. **Stroke**, v. 50, n. 10, p. 2948–2951, 1 out. 2019.

DICHGANS, M.; LEYS, D. **Vascular Cognitive Impairment** *Circulation Research* **Circ**

Res, , 3 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28154105/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

ESKO, J. D.; SELLECK, S. B. **Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in**

heparan sulfate *Annual Review of Biochemistry* **Annu Rev Biochem**, , 2002. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12045103/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

FARRALL, A. J.; WARDLAW, J. M. Blood–brain barrier: Ageing and microvascular disease – systematic review and meta-analysis. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 3, p. 337–352, mar. 2009.

FEIGIN, I.; POPOFF, N. **NEUROPATHOLOGICAL CHANGES LATE IN CEREBRAL**

EDEMA: THE RELATIONSHIP TO TRAUMA, HYPERTENSIVE DISEASE AND BINSWANGER'S ENCEPHALOPATHY. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 22, p. 500–11, jul. 1963.

FELDMAN, H. et al. A Canadian Cohort Study of Cognitive Impairment and Related Dementias (ACCORD): Study methods and baseline results. **Neuroepidemiology**, v. 22, n. 5, p. 265–274, 2003.

FRANSSON, L. Å. et al. **Novel aspects of glypican glycobiology** **Cellular and Molecular Life Sciences** Cell Mol Life Sci, , maio 2004. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15112050/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

GORELICK, P. B. et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 42, n. 9, p. 2672–2713, 2011.

GÖTTE, M.; ECHTERMEYER, F. Syndecan-1 as a Regulator of Chemokine Function. **The Scientific World JOURNAL**, v. 3, p. 1327–1331, 11 dez. 2003.

GRINBERG, L. T. et al. Prevalence of dementia subtypes in a developing country: a clinicopathological study. [s.d.].

GUO, S. et al. Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 21, p. 7582–7587, 27 maio 2008.

HACHINSKI, V. et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. **Stroke**, v. 37, n. 9, p. 2220–2241, set. 2006.

HACHINSKI, V. C. et al. Cerebral Blood Flow in Dementia. **Archives of Neurology**, v. 32, n. 9, p. 632–637, 1975.

HASCALL, V. C.; WEIGEL, P. H.; TOOLE, B. P. Hyaluronan. In: **Encyclopedia of Cell**

Biology. [s.l.] FASEB J, 2016. v. 1p. 279–287.

HENRY, C. B. S.; DULING, B. R. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 277, n. 2 46-2, 1999.

IADECOLA, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 347–360, 1 maio 2004.

IADECOLA, C. The Pathobiology of Vascular Dementia. **Neuron**, v. 80, n. 4, p. 844–866, 20 nov. 2013.

IADECOLA, C.; NEDERGAARD, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1369–1376, 1 nov. 2007.

IADECOLA, C.; PARK, L.; CAPONE, C. Threats to the Mind: Aging, Amyloid, and Hypertension. **Stroke**, v. 40, n. 3, Supplement 1, p. S40–S44, 1 mar. 2009.

KLITZMAN, B.; DULING, B. R. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 6, n. 4, 1979.

LI, Q. et al. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. **Circulation**, v. 98, n. 14, p. 1438–1448, 6 out. 1998.

LIPOWSKY, H. H. **Microvascular rheology and hemodynamics** **Microcirculation** **Microcirculation**, , jan. 2005. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15804970/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

LIPOWSKY, H. H.; KOVALCHECK, S.; ZWEIFACH, B. W. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. **Circulation Research**, v. 43, n. 5, p. 738–749, 1978.

LIU, W. et al. Influence of Amyloid- β on Cognitive Decline after Stroke/Transient Ischemic Attack: Three-Year Longitudinal Study. **Stroke**, v. 46, n. 11, p. 3074–3080, 1 nov. 2015.

MADDEN, D. J. et al. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter integrity in cognitive aging. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 3, p. 386–400, mar. 2012.

MALAVAKI, C. et al. **Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease** **Connective Tissue Research** **Connect Tissue Res**, , maio 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18661328/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

MANIEGA, S. M. et al. White matter hyperintensities and normal-appearing white matter integrity in the aging brain. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 2, p. 909–918, fev. 2015.

MARTENS, R. J. H. et al. Sublingual microvascular glycoalyx dimensions in lacunar stroke patients. **Cerebrovascular Diseases**, v. 35, n. 5, p. 451–454, 2013.

MARTINS-FILHO, R. K. et al. **Biomarkers Related to Endothelial Dysfunction and Vascular Cognitive Impairment: A Systematic Review** **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders** **Dement Geriatr Cogn Disord**, , 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33045717/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

MATTHEWS, F. E. et al. Epidemiological pathology of dementia: Attributable-risks at death in the medical research council cognitive function and ageing study. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 11, nov. 2009.

MIRANDA, C. H. et al. Evaluation of the endothelial glycoalyx damage in patients with acute coronary syndrome. **Atherosclerosis**, v. 247, p. 184–188, 1 abr. 2016.

MIYAO, S. et al. Leukoaraiosis in relation to prognosis for patients with lacunar infarction. **Stroke**, v. 23, n. 10, p. 1434–1438, 1992.

MOCHIZUKI, S. et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2 54-2, 1 ago. 2003.

MORETTI, R. et al. Behavioral alterations and vascular dementia. **Neurologist**, v. 12, n. 1, p. 43–47, jan. 2006.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181–198, 29 jul. 2010.

MULIVOR, A. W.; LIPOWSKY, H. H. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 5 55-5, maio 2004.

NANDI, A.; ESTESS, P.; SIEGELMAN, M. H. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 14939–14948, 19 maio 2000.

NIAN, K. et al. **Blood-Brain Barrier Damage in Ischemic Stroke and Its Regulation by Endothelial Mechanotransduction** **Frontiers in Physiology** *Front Physiol*, , 22 dez. 2020.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33424628/>>. Acesso em: 17 jun. 2022

NIEUWDORP, M. et al. **The endothelial glycocalyx: A potential barrier between health and vascular disease** **Current Opinion in Lipidology** *Curr Opin Lipidol*, , 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16148534/>>. Acesso em: 17 jun. 2022

NIEUWDORP, M. et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 480–486, fev. 2006.

OLIVER, M. G. et al. Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. **Inflammation**, v. 15, n. 5, p. 331–346, out. 1991.

PANTONI, L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 689–701, jul. 2010.

PENDLEBURY, S. T.; ROTHWELL, P. M. Prevalence, incidence, and factors associated

with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11, p. 1006–1018, nov. 2009.

PETERSON, E. C.; WANG, Z.; BRITZ, G. Regulation of cerebral blood flow. **International journal of vascular medicine**, v. 2011, p. 823525, 2011.

PRIES, A. R.; SECOMB, T. W. **Rheology of the microcirculation**. Clinical Hemorheology and Microcirculation. **Anais...Clin Hemorheol Microcirc**, 2003Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14724335/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

RAHBAR, E. et al. Endothelial glycocalyx shedding and vascular permeability in severely injured trauma patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 12 abr. 2015.

REITSMA, S. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 454, n. 3, p. 345–359, 26 jun. 2007.

ROMÁN, G. C. et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. **Neurology**, v. 43, n. 2, p. 250–60, 1 fev. 1993.

RUBANYI, G. M.; ROMERO, J. C.; VANHOUTTE, P. M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 250, n. 6 (19/6), 1986.

SACHDEV, P. et al. Diagnostic criteria for vascular cognitive disorders: A VASCOG statement. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 28, n. 3, p. 206–218, 2014.

SACHDEV, P. S. et al. The neuropsychological profile of vascular cognitive impairment in stroke and TIA patients. **Neurology**, v. 62, n. 6, p. 912–919, 23 mar. 2004.

SAMUELSSON, M.; SÖDERFELDT, B.; OLSSON, G. B. Functional outcome in patients with lacunar infarction. **Stroke**, v. 27, n. 5, p. 842–6, maio 1996.

SARELIUS, I. H.; DULING, B. R. Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity, and transit time. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 12, n. 6, 1982.

- SATIZABAL, C. L. et al. Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 523–532, 11 fev. 2016.
- SCHNEIDER, J. A. et al. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. **Neurology**, v. 69, n. 24, p. 2197–2204, 2007.
- SCHNEIDER, J. A. et al. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 2, p. 200–208, ago. 2009.
- SELNES, O. A.; VINTERS, H. V. Vascular cognitive impairment. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 10, p. 538–547, 2006.
- SERRATS, J. et al. Dual Roles for Perivascular Macrophages in Immune-to-Brain Signaling. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 94–106, 14 jan. 2010.
- SHI, Y.; WARDLAW, J. M. Update on cerebral small vessel disease: a dynamic whole-brain disease. **Bmj**, v. 1, n. 3, p. 83–92, 2016.
- SKOOG, I. Risk Factors for Vascular Dementia: A Review. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 5, n. 3–4, p. 137–144, 1994.
- SKROBOT, O. A. et al. The Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study. **Alzheimer's and Dementia**, v. 13, n. 6, p. 624–633, 1 jun. 2017.
- SMITH, E. **Vascular cognitive impairment** **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042905>>. Acesso em: 8 maio. 2018
- SMITH, E. E. **Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia** **Clinical Science** Clin Sci (Lond), , 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28515342/>>. Acesso em: 16 jun. 2022
- SNYDER, H. M. et al. **Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease** **Alzheimer's and Dementia** Elsevier Inc., , 1 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25510382>>. Acesso em: 6 abr. 2020

SONNEN, J. A. et al. Pathological correlates of dementia in a longitudinal, population-based sample of aging. **Annals of Neurology**, v. 62, n. 4, p. 406–413, out. 2007.

STAEKENBORG, S. S. et al. Neurological signs in relation to type of cerebrovascular disease in vascular dementia. **Stroke**, v. 39, n. 2, p. 317–322, fev. 2008.

TATEMICHII, T. K. et al. Confusion and memory loss from capsular genu infarction: a thalamocortical disconnection syndrome? **Neurology**, v. 42, n. 10, p. 1966–79, out. 1992.

TENG, Y. H. F.; AQUINO, R. S.; PARK, P. W. **Molecular functions of syndecan-1 in disease****Matrix Biology**Matrix Biol, , jan. 2012. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22033227/>>. Acesso em: 17 jun. 2022

TER TELGTE, A. et al. **Cerebral small vessel disease: From a focal to a global perspective****Nature Reviews Neurology**Nat Rev Neurol, , 1 jul. 2018. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29802354/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

THANVI, B.; LO, N.; ROBINSON, T. **Vascular parkinsonism - An important cause of parkinsonism in older people****Age and Ageing**Age Ageing, , mar. 2005. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15713855/>>. Acesso em: 16 jun. 2022

TRAPP, B. D.; STYS, P. K. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 3, p. 280–291, mar. 2009.

UEDA, A. et al. Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 5 56-5, nov. 2004.

VAN DEN BERG, B. M. et al. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 2, fev. 2006.

VAN DER FLIER, W. M. et al. Vascular cognitive impairment. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 15 fev. 2018.

- VAN DER VEEN, P. H. et al. Longitudinal Relationship Between Cerebral Small-Vessel Disease and Cerebral Blood Flow: The Second Manifestations of Arterial Disease-Magnetic Resonance Study. **Stroke**, v. 46, n. 5, p. 1233–1238, 1 maio 2015.
- VERMEER, S. E. et al. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam scan study. **Stroke**, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2002.
- VERMEER, S. E. et al. Silent Brain Infarcts and the Risk of Dementia and Cognitive Decline. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 13, p. 1215–1222, 27 mar. 2003.
- VINK, H.; DULING, B. R. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, n. 1 47-1, 2000.
- VOGEL, J. et al. Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 11, p. 1571–1578, 2000.
- WARD, N. L.; LAMANNA, J. C. The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems. **Neurological Research**, v. 26, n. 8, p. 870–883, 19 dez. 2004.
- WARDLAW, J. M. et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 8, p. 822–838, ago. 2013.
- WEIGEL, P. H.; HASCALL, V. C.; TAMMI, M. **Hyaluronan synthases** **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6197–6201, 30 maio 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9206724/>>. Acesso em: 17 jun. 2022
- WENTZEL, C. et al. Progression of impairment in patients with vascular cognitive impairment without dementia. **Neurology**, v. 57, n. 4, p. 714–716, 28 ago. 2001.
- WOLFSON, L. et al. Rapid buildup of brain white matter hyperintensities over 4 years linked to ambulatory blood pressure, mobility, cognition, and depression in old persons. **The**

journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, v. 68, n. 11, p. 1387–94, nov. 2013.

YAMAMOTO, Y. et al. Twenty-four-hour blood pressure and MRI as predictive factors for different outcomes in patients with lacunar infarct. **Stroke**, v. 33, n. 1, p. 297–305, jan. 2002.

YANG, Y. et al. Matrix Metalloproteinase-Mediated Disruption of Tight Junction Proteins in Cerebral Vessels is Reversed by Synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitor in Focal Ischemia in Rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 697–709, 19 abr. 2007.

YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. **Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke****Brain Research**, , 14 out. 2015. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25916577/>>. Acesso em: 17 jun. 2022

ZACCHIGNA, S.; LAMBRECHTS, D.; CARMELIET, P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 169–181, 1 mar. 2008.

ZHOU, Z. et al. **Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Alzheimer’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis****Frontiers in Aging Neuroscience**Frontiers Media S.A., , 30 jan. 2020.

ZHU, J. et al. Glycocalyx degradation leads to blood–brain barrier dysfunction and brain edema after asphyxia cardiac arrest in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 11, p. 1979–1992, 1 nov. 2018.

ANEXOS

A) Revisão sistemática publicada no periódico “Dementia and Geriatric Cognitive Disorders” (Fator de Impacto: 3,3)

Dementia and
Geriatric Cognitive
Disorders

Systematic Review

Dement Geriatr Cogn Disord 2020;49:365–374
DOI: 10.1159/000510053

Received: May 28, 2020
Accepted: July 7, 2020
Published online: October 12, 2020

Biomarkers Related to Endothelial Dysfunction and Vascular Cognitive Impairment: A Systematic Review

Rui Kleber Martins-Filho^a Maria Clara Zotin^b Guilherme Rodrigues^a
Octavio Pontes-Neto^a

^aDepartment of Neurosciences and Behavioural Sciences, Hospital das Clínicas – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^bDepartment of Internal Medicine, Radiology Division, Hospital das Clínicas – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Keywords

Endothelial dysfunction · Vascular cognitive impairment · Vascular dementia · Cerebral small vessel disease

Abstract

Introduction: The damage in the endothelium and the neurovascular unit appears to play a key role in the pathogenesis of vascular cognitive impairment (VCI). Although there have been many advances in understanding the pathophysiology of this disease, several questions remain unanswered. The association with other degenerative diseases and the heterogeneity of its clinical spectrum establish a diagnostic problem, compromising a better comprehension of the pathology and halting the development of effective treatments. The investigation of biomarkers is an important movement to the development of novel explicative models and treatment targets involved in VCI. **Methods:** We searched MEDLINE considering the original research based on VCI biomarkers in the past 20 years, following prespecified selection criteria, data extraction, and qualitative synthesis. **Results:** We reviewed 42 articles: 16 investigated plasma markers, 17 analyzed neuropathological markers, 4 studied CSF markers, 4 evaluated neuroimaging markers (ultrasound and MRI),

and 1 used peripheral Doppler perfusion imaging. **Conclusions:** The biomarkers in these studies suggest an intrinsic relationship between endothelial dysfunction and VCI. Nonetheless, there is still a need for identification of a distinctive set of markers that can integrate the clinical approach of VCI, improve diagnostic accuracy, and support the discovery of alternative therapies. © 2020 S. Karger AG, Basel

Introduction

Small vessel disease (SVD) is a clinical-radiological syndrome caused by a disorder in perforating cerebral arterioles, capillaries, and venules, resulting in lesions of cerebral white and deep gray matter [1]. It is responsible for about 20% of strokes and 45% cases of dementia in the world [2, 3]. Endothelial cells appear to have a pivotal role in the pathogenesis of cerebral SVD and vascular dementia (VaD). Endothelial dysfunction (ED) may contribute to SVD pathology through multiple mechanisms, such as blood-brain barrier (BBB) damage, decrease in whole-brain or tissue-resting cerebral blood flow, loss of cerebral vasoreactivity, and increase in intracranial pulsatility [4].

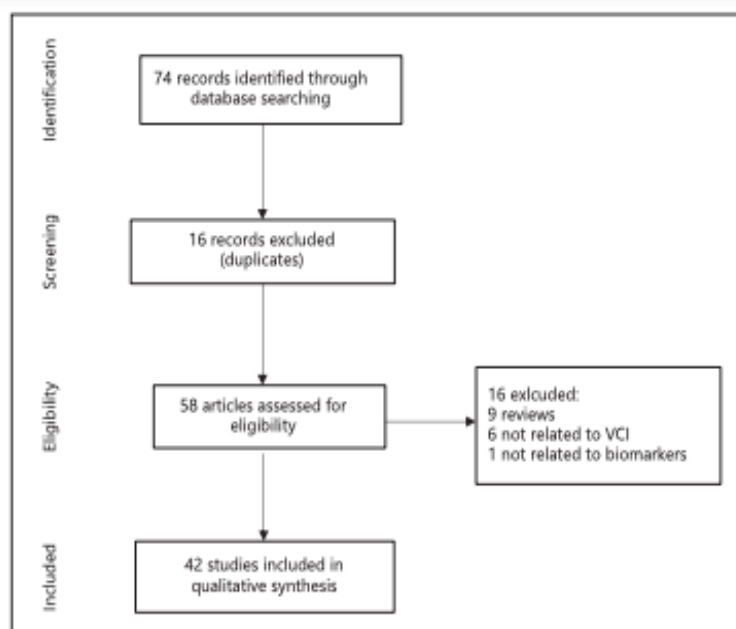


Fig. 1. Flow of information through the different phases of this systematic review. VCI, vascular cognitive impairment.

Moreover, ED may represent a potential link between cerebral SVD and Alzheimer's pathology. For example, the leakage of fibrinogen through vessel walls contributes to amyloid-beta ($A\beta$) plaque formation [1] and disrupted transport across the BBB plays a significant role in determining $A\beta$ concentrations in the central nervous system (CNS) [5, 6].

Recently, Alzheimer's Disease-Related Dementias Summit set the study of small vessel VCI biomarkers as a research priority [7]. Considering that a thorough review analyzing markers of ED in patients with VCI is lacking, we carried out a systematic review on biomarkers of ED in VCI studies undertaken in the last 20 years.

Methods

Search Strategy, Study Selection, and Data Acquisition

We searched MEDLINE for studies investigating ED and VCI with the following free text and Medical Subject Headings (MeSH): "endothelium" or "endothelial" and "cognitive impairment" or "dementia." We limited the search to articles written in English, with human adults as subjects and published in the last 20 years (search period between January 1, 1999, and December 31, 2019).

According to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement [8], 2 investigators (R.K.M.F. and G.R.) searched MEDLINE independently and compared their results. Differences in the screening phase were re-

solved by consensus. Three investigators (R.K.M.F., M.C.Z., and G.R.) carried out data extraction independently. They stored the variables in a spreadsheet especially developed for this review, tabulating the following data: number of participants, population studied, study design, biomarker of interest, source of biomarker, and main results.

Results

The combined terms yielded 74 articles: "endothelial" and "vascular cognitive impairment" – 5 articles; "endothelium" and "vascular cognitive impairment" – 3 articles; "endothelial" and "vascular dementia" – 49 articles; and "endothelium" and "vascular dementia" – 17 articles. After excluding studies in duplicates, 58 articles remained. In sequence, R.K.M.F. and G.R. independently reviewed all identified abstracts and excluded articles that met any of the following criteria: (a) articles not related to VCI; (b) no original research (i.e., reviews, editorials, and letters); (c) research not focused on endothelial biomarkers. Again, any discrepancies were resolved by consensus.

From 58 articles initially identified, we excluded 16 papers in this second phase (9 reviews, 6 not related to VCI, and 1 did not study biomarkers) as shown in Figure 1. From the 42 articles included in the qualitative synthesis,

Table 1. Main biomarkers related to ED in VCI [9, 12–21, 23–30, 35–37, 40, 41, 44, 45, 48, 53–55]

Category	Reference
<i>BBB dysfunction markers</i>	
↑CSF:plasma albumin ratio	[9]
Adhesion molecules: ↑ICAM-1, VCAM-1, and sICAM-1	[9, 12, 13]
Plasmatic inflammatory markers: ↑platelet factor IV, CD40 ligand, homocysteine, interleukin-6, TNF- α , and C-reactive protein	[13–16]
Endothelial function mediators: ↑endothelin-1, natriuretic atrial peptide, von Willebrand factor, and angiopoietin-2; ↓NO synthase	[17–21]
Endothelial assembly: ↑collagen types I and IV, kallikrein 6, occludin, and claudin	[23–27]
<i>Perfusional and hemodynamic markers</i>	
↑VEGF and TGF- β	[9, 29]
No change: VEGF	[28, 30]
Neoangiogenesis	[35, 36]
↓MAG:PLP1 ratio (hypoperfusion)	[37]
↑ANGPTL4, ET-1, thrombomodulin, and dihydroxyeicosatrienoic acid	[40, 41, 44, 55]
<i>Vasoreactivity markers</i>	
↓Cerebral vasoreactivity to CO ₂	[45]
↓Peripheral vasoreactivity	[45]
↓DBF after capsaicin	[48]
<i>Other markers</i>	
↑ β -amyloid 40 (vasoconstrictive effect)	[53]
↓CD34 and CD133 (endothelial progenitor cells)	[54]
↑Serum NFL (neuroaxonal damage)	[56]

ED, endothelial dysfunction; VCI, vascular cognitive impairment; BBB, blood-brain barrier; CSF, cerebral spinal fluid; ICAM-1, brain endothelial intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, plasma level of soluble intercellular adhesion molecule 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; TGF- β , transforming growth factor β ; MAG, myelin-associated glycoprotein; PLP1, proteolipid protein 1; ANGPTL4, angiopoietin-like 4; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; NO, nitric oxide; ET-1, endothelin-1; DBF, dermal blood flow; NFL, neurofilament light chain.

16 investigated plasma markers, 17 analyzed neuropathological markers, 4 studied CSF markers, 4 evaluated neuroimaging markers (ultrasound and MRI), and 1 dealt with peripheral Doppler perfusion imaging. The main findings of each study are summarized in online suppl. Table 1; for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000510053.

Discussion

Summary of Evidence

This systematic review aims to describe biomarkers that target pathways linking ED with cerebral SVD and VCI. We divided such markers into those related to BBB dysfunction, those related to perfusional and hemodynamic changes, and those that assess cerebrovascular and peripheral reactivity. Table 1 summarizes the most important known facts to each category. Some of the main

markers are represented in a schematic model illustrated in Figure 2.

Blood-Brain Barrier Dysfunction

A functional BBB depends on the adequate interaction between the many components of the neuroglivascular unit to regulate the transit of fluid and nutrients between intravascular and interstitial spaces, maintaining CNS homeostasis [9]. Biochemical markers, found in the CSF and the plasma, are related to BBB dysfunction in patients with VCI.

CSF/Plasma Albumin Ratio

The ratio between albumin levels in CSF and plasma (Qalb), though not specific, represents a commonly used method to measure the degree of disruption of BBB. Janelidze et al. [9] found increased Qalb in participants with multiple forms of dementia, although only slightly higher values were demonstrated among subjects with

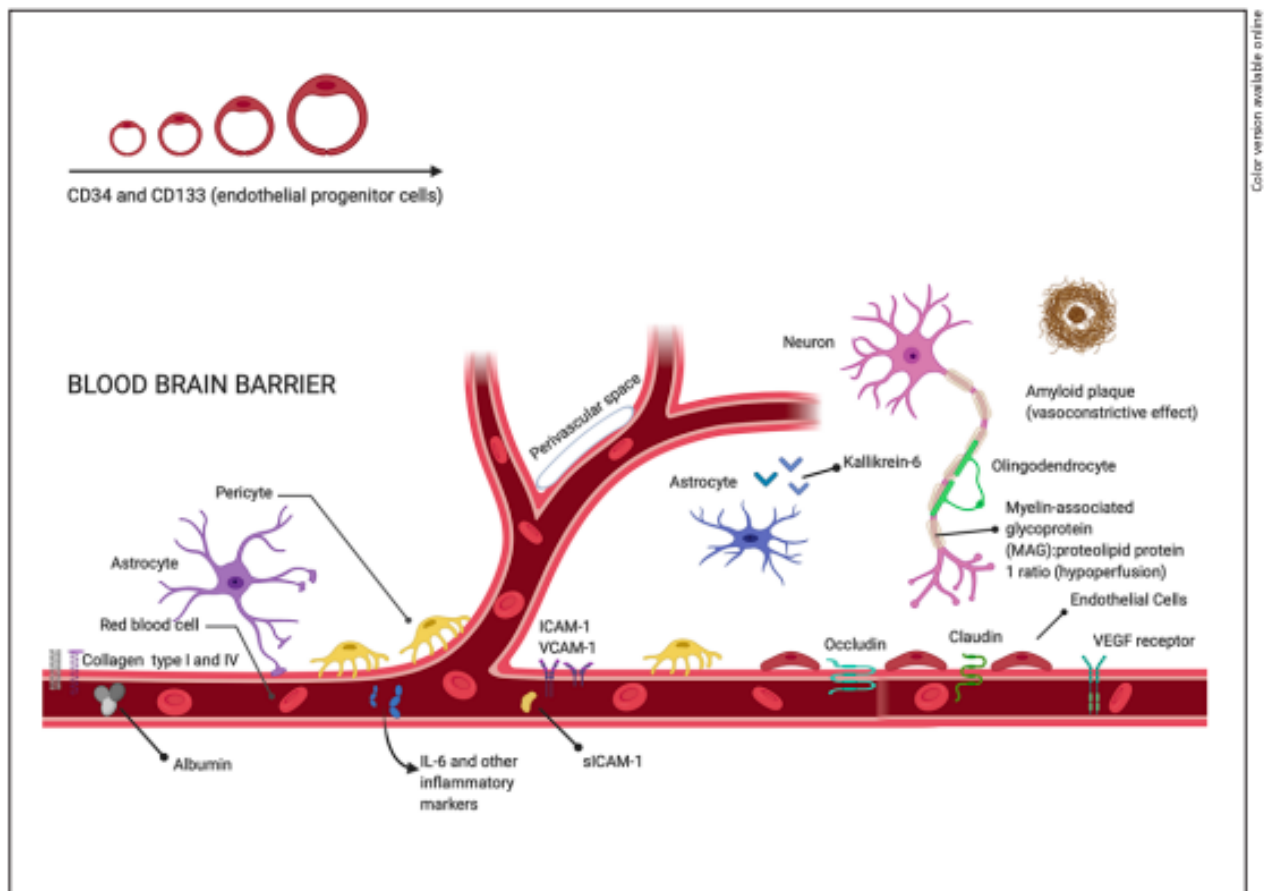


Fig. 2. Schematic model illustrating some of the key markers covered in this review (customized with BioRender). ICAM-1, brain endothelial intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, plasma level of soluble intercellular adhesion molecule 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; MAG, myelin-associated glycoprotein; PLP1, proteolipid protein 1.

VaD. These findings suggest that BBB dysfunction may be a common feature in different dementia types. Interestingly, Qalb was associated with diabetes mellitus (DM) and obesity markers were associated with increased Qalb 2 decades later [9]. These findings are in line with the expected endothelial damage induced by inflammatory and oxidative effects of chronic DM and support the pathophysiological link between vascular risk factors and dementia [9–11].

Adhesion Molecules (ICAM-1, VCAM-1, and sICAM-1)

Endothelial cells express intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-

1), which participate in transendothelial migration and endothelial cell activation. ICAM-1 and VCAM-1 were up-regulated in peripheral vascular dysfunction related to DM [9]. In a small subgroup of patients with DM, there is a higher CSF level of ICAM-1 and VCAM-1, which correlated positively with Qalb levels, suggesting that endothelial damage related to DM may affect cerebral vessels [9].

The measure of the plasmatic soluble portion of ICAM-1 (sICAM-1) is an independent factor for the onset and severity of white matter disease in patients older than 60 years without a history of neurological disease. In a study with VaD and AD patients, these vascular adhesion molecules had higher levels in plasma compared with the control group [13].

Plasmatic Inflammatory Markers

Markers such as platelet factor IV, CD40 ligand, homocysteine, and interleukin-6 are associated with radiological progression of cerebral SVD in patients with lacunar stroke, VaD, and vascular parkinsonism [14]. These findings are in line with the increase in interleukin-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with VaD compared with late-onset AD [13]. Basolateral interleukin-6 secretion raises in dyslipidemic patients with AD, with or without vascular risk factors [15]. C-reactive protein levels were associated with reduced verbal fluency in nondementia patients with moderate-to-high cardiovascular risk [16].

Endothelial Function Mediators

Endothelial function regulators and vasodilators, such as endothelin-1 (ET-1) and atrial natriuretic peptide, respectively, are associated with an increased risk of VaD [17]. In a randomized clinical trial investigating the use of medicinal herbs in diabetic patients with VaD, both treatments (the investigational herb and the use of pioglitazone) decreased ET-1 levels after the intervention with a concomitant increase in plasma nitric oxide [18]. The nitric oxide (NO), known as an "endogenous anti-atherosclerotic" agent, is a pivotal mediator of endothelial function, and inhibitors of endothelial NO synthase, such as the asymmetric form of dimethylarginine (ADMA), were investigated in 2 registries [16, 19]. In the first, ADMA levels are independently associated with silent cerebral infarcts [19]. In the second, ADMA levels were associated with low verbal memory performance in asymptomatic patients with moderate-to-high cardiovascular risk [16].

In TREN1 mutation carriers, a genetic cause of SVD triggered primarily by ED, levels of von Willebrand factor (VWF), and angiopoietin-2 were increased. They were also related to disease activity, mainly in individuals older than 40 years [20, 21].

On the other hand, antibodies against heparan sulfate (HS Abs), a glycosaminoglycan present in endothelial cells, which plays an important role in angiogenesis, the integrity of vessels' barrier, and processes of cell adhesion were similar in patients with dementia (VaD and AD) and controls [22].

Neuropathological Findings

Neuropathological studies show structural changes in the BBB of patients with VaD with an increment in collagen types I and IV and fibrohyalinosis in brain vessels of VaD subjects [23]. In addition, there is a higher expres-

sion of kallikrein 6, whose substrates include fibronectin, fibrinogen, collagen types I and VI, and laminin [24, 25].

Tight junctions form an essential structure for the correct functioning of the BBB, and its main components are claudin and occludin proteins. In individuals with VaD, there is a rise in occludin and claudin expression, suggesting a possible compensatory phenomenon [26, 27].

Markers Related to Perfusional and Hemodynamic Changes

Angiogenic Factors (HIF-1 α , VEGF, TNF- α , TGF- β , NGF, and BDNF)

Multiple cytokines have been recently studied for their interconnected role in neuroprotective pathways associated with ischemia and hypoxia-induced brain injury. Many of these cytokines have in common a regulatory effect on the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF is a cytokine secreted by astrocytes with significant neurotrophic and neuroprotective effects that binds to endothelial cells to regulate angiogenesis and vascular permeability [26–28, 31]. Hypoxia-inducible factor (HIF) is a transcription factor that mediates neuroprotective effects related to hypoxia conditioning and ischemia and induces upregulation of VEGF [28]. Nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic growth factor (BDNF) have also demonstrated neuroprotective effects under hypoxia/ischemia-induced brain injury by inducing expression of VEGF, through a pathway dependent on HIF-1 α [28]. TNF- α is a cytokine with proinflammatory effects that upregulates transforming growth factor β (TGF- β) and induces VEGF production [29]. TGF- β has anti-inflammatory effects and also upregulates VEGF [29]. Animal models suggest that TGF- β is also associated with amyloidogenesis [29].

Janelidze et al. [9] found higher VEGF levels in CSF of patients with different forms of dementia in comparison with controls, with a slightly higher index of bioactive levels of VEGF among patients with VaD, supporting that concomitant vascular factors may participate in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. CSF VEGF correlated positively with Qalb, which is in line with the expected increase in BBB permeability induced by VEGF [9]. However, even subgroups without increased Qalb showed higher CSF VEGF levels, which could mean that upregulation of VEGF may precede BBB dysfunction [9]. The GTC haplotype in the VEGF gene is related to VaD, supporting the pathogenic role of this angiogenic factor [33]. There is an increase in CSF VEGF and TGF- β levels in patients with AD and VaD, supporting a potential role in both forms of dementia [29]. Increased levels of intra-

thecal TNF- α have also been described among patients with stroke, AD, and VaD [29].

In contrast, Chakraborty et al. [30] found no significant difference in CSF VEGF levels across patients with VaD, AD, and controls. Ke et al. [28] also did not find significant differences in intrathecal levels of VEGF or BDNF in patients with ischemic cerebrovascular diseases and VCI compared with controls. There were, however, unexpectedly lower levels of HIF-1 α and NGF in pathological groups in comparison with controls, which were hypothesized to be secondary to the limited duration of upregulation of those markers in response to ischemia [28].

In another study, patients with VaD showed decreased secretion of VEGF by peripheral lymphocytes, similar to what was found in the healthy elderly [32]. AD patients showed a more substantial decrease in VEGF secretion, hypothesized to be potentially due to an inhibitory effect of amyloid- β 42, which could be compromising angiogenesis and the ability to maintain oxygen and nutrient delivery to the brain in those subjects [32].

Overall, these inconsistent results suggest that angiogenic factors may play a yet incompletely understood role in multiple forms of dementia, including vascular and neurodegenerative pathologies. Studies with VEGF CSF levels in AD populations have also yielded inconsistent results [29, 30, 34].

Neuropathological Findings

VaD patients have perfusional changes and neovascularization [35]. Burke et al. [36] found a higher length density of hippocampal microvessels in those cases. The vessels were narrower than those without dementia, suggesting an ineffective neoangiogenesis [36].

The white matter hypoperfusion reduces the relation of myelin-associated glycoprotein (MAG) to proteolipid protein 1 (PLP1) [37]. In subjects with VaD, this ratio is decreased [38]. A reduction in MAG:PLP1 values correspond to an elevation in VEGF levels, which associates with a raise in white matter vascular density [37]. However, this increment in VEGF has not been found in subsequent studies [38, 39]. Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) is a protein linked to neovascularization, whose production grows in hypoxia situations [40]. A later study on the brains of VaD patients showed an increase in ANGPTL4 levels in these individuals [41].

Cerebral hypoperfusion triggers compensatory mechanisms to restore blood flow. Endothelin (ET) is a vasoconstrictive peptide produced by endothelial vascular cells and formed by the endothelin-converting enzyme

(ECE) [42]. Therefore, a decrease in MAG:PLP1 values correlates with a decrease in endothelin-1 (ET-1) levels. However, in VaD patients, this protective mechanism fails as there is an increase in ET-1 levels and ECE-1 expression remains normal [37, 43].

Other evidence of hemodynamic changes in brains of patients with VaD is a higher expression of the anti-thrombotic thrombomodulin in subjects with VaD [44] and raised levels of the vasodilator dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) [55]. The DHET increment is likewise a compensatory mechanism since patients with the R287Q polymorphism in the soluble epoxide hydrolase gene, the enzyme that produces DHET, have a higher volume of white matter lesions [55].

Vasoreactivity

Vasoreactivity represents the vascular ability to undergo adaptive changes in response to vasodilatory stimuli, such as metabolic changes and increases in neuronal activity [1, 45]. Cerebral vasoreactivity (CVR) is strongly dependent on the normal function of the neurogliovascular unit and may indirectly reflect the efficacy of collateral circulation [46]. Studies suggest that cerebral vasoreactivity may already be impaired when resting cerebral blood flow is still within normal ranges, making vasoreactivity markers particularly promising in patients with SVD [1]. Assessment of cerebral vasoreactivity is possible through multiple techniques, such as single-photon emission tomography (SPECT), PET, and transcranial Doppler ultrasound (TCD) [45].

Cerebral Vasoreactivity Measured through TCD

Assessment of cerebral vasoreactivity through TCD involves the calculation of the percent increase in the mean flow velocity (MFV) of the middle cerebral artery (MCA) in response to different stimuli such as acetazolamide, variation in CO₂ levels (induced by hypo- or hyperventilation), and administration of L-arginine. L-Arginine is the precursor of NO, representing a useful tool to assess vasodilation mediated by endothelial cells and executed by vascular smooth muscle cells (VSMC) [47]. On the other hand, direct administration of sublingual nitroglycerin can assess vasoreactivity independent of endothelial cells, offering a more direct assessment of VSMC function [48].

Staszewski et al. [45] showed diminished CVR in response to breath-holding maneuvers in patients with lacunar stroke, VaD, and vascular parkinsonism compared with matched controls. CVR was reduced among participants with severe brain atrophy, enlarged perivascular

spaces, and extensive white matter lesions. Both white matter lesions and CSVD burden score on MRI correlated with CVR [45].

In CADASIL patients, there is a higher MCA resting pulsatility index and increased L-arginine-induced vasoreactivity when compared with controls. These findings imply that large cerebral arteries of CADASIL subjects may present impaired endothelial function, but inconsistent results and methodological concerns argue against this interpretation [45, 46, 49, 50]. Other findings reinforce that the degeneration of VSMC from small vessels mediates vascular reactivity impairment in CADASIL [47, 48].

Peripheral Vasoreactivity

Extracerebral Vasoreactivity Measured by Doppler US Flow-Mediated Dilatation

Brachial artery flow-mediated dilatation (FMD) is a useful marker of extracerebral endothelial function in conduit vessels [45, 48]. In this technique, the diameter of the brachial artery is measured serially before and after hyperemia induced by deflating a sphygmomanometer cuff distal to the US site. In order to evaluate endothelium-independent vasodilation capacity, NTG can be administered, followed by consecutive measurements of the diameter of the brachial artery [48].

In patients with severe sporadic SVD or VaD, there is a lower FMD when compared with control subjects, in agreement with concomitant findings of reduced CVR [45, 51]. These findings suggest that in the setting of CSVD, the vasoreactivity impairment may also be found in systemic vessels and could be more easily accessible through peripheral vessels than through cerebral vessels [45]. A positive, though weak, correlation between CVR and FMD was found in CSVD patients, suggesting an association between peripheral and cerebral vasoreactivity dysfunction in this population [45]. Moreover, the significant correlation between FMD and Mini-Mental State Examination (MMSE) implies that ED relates to cognitive impairment [51]. Reduced FMD has also been reported among AD subjects, suggesting that ED may also play a role in neurodegenerative pathologies [51].

In the setting of monogenic SVD pathologies, de Boer et al. [48] employed FMD in patients with RVCL-S and with CADASIL and found reduced dilation only in the former group. Even though VSMC degeneration is a feature of CADASIL, de Boer and colleagues did not find a significant reduction in FMD after nitroglycerin administration in this population, which corroborates the belief that small vessels, rather than conduit vessels, are primarily affected in this pathology [48].

Capsaicin-Induced Dermal Blood Flow Variation

Laser Doppler perfusion imaging can access the dermal blood flow (DBF) variation in response to stimuli such as topical administration of capsaicin, with the advantage of providing information about microcirculatory vessels instead of conduit vessels, as is the case with FMD [48]. de Boer et al. [48] found reduced DBF after capsaicin application in patients with CADASIL, which is hypothesized to be associated with impairment of VSMC relaxation in response to endothelial-independent stimuli.

Forearm Resistance Vessel Function Assessment

This technique involves cannulation of the brachial artery and measures variation of forearm blood flow in response to different vasoactive agents, such as acetylcholine (induces vasodilation dependent on endothelial cells), nitroprusside (NO donor that induces vasodilation independent of endothelial function), and verapamil (directly acts on VSMC independently of endothelial cells or NO) [52]. Moser et al. [52] found a significant association between VSMC function, measured with the administration of verapamil, and performance on neuropsychological tests for initiation and processing speed in a population with early-stage atherosclerotic vascular disease. Curiously, the same was not found with endothelial function [52].

Other Markers

In a study of 149 stroke patients with SVD, β -amyloid-40 levels were correlated with diffuse SVD disease rather than isolated lacunar strokes [53]. Such findings may represent a direct and vasoconstrictive toxic effect of this peptide against the endothelium, leading to BBB dysfunction [53].

Quantitative evaluation of endothelial progenitor cells also appears to be associated with VaD and AD. Two markers, CD34 and CD133, are particularly useful in this assessment. CD34 identifies endothelial lineage cells, and CD133 allows the quantification of immature lineages, whereas the double staining of these cells allows a measure of reserve capacity and turnover of endothelial cells [54]. Xiao-dong et al. [54] found a decrease in cell levels with these markers compared with the control group, while patients with AD showed not only a quantitative reduction in progenitor cells but also a correlation with a worse performance in the MMSE.

In addition, SVD burden has been associated with the increment of serum neurofilament light chain (NfL), as demonstrated by Dering et al. [56]. In this study, serum NfL was related to processing speed performance, focal

neurological symptoms, and disability in patients with CADASIL and sporadic SVD. As a marker of neuroaxonal damage, increased NFL levels in this population suggest that axonal lesion and neuronal loss might be the ultimate consequence of a broader cascade of pathological events involved in SVD [56].

Conclusions

This review suggests an intrinsic relationship between ED and VCI, establishing the endothelium as a pivotal target involved in the pathogenesis of the disease. The biomarkers studied indicate a dynamic and whole-brain process. The BBB has its integrity affected, as demonstrated by the higher CSF/plasma albumin ratio and the increment of collagen types I and IV and fibrohyalinosis. Besides, several inflammatory markers (e.g., interleukin-6, TNF- α , and C-reactive protein) are upregulated, also impairing BBB permeability.

Hemodynamic biomarkers' dynamic, for its part, suggests a state of hypoperfusion (e.g., decrease in MAG:PLP1 ratio) and abnormal vasoreactivity (e.g., abnormal CO₂ vasodilation). As a consequence, mechanisms of compensation for ineffective neoangiogenesis (increase in ANGPTL4 and ET-1 levels and decrease in CD34+ and CD133+ progenitor endothelial cells) and antithrombogenicity (higher thrombomodulin levels) would eventually culminate in a vicious cycle of lesion progression. Finally, it is essential to note that the significant heterogeneity of subjects investigated and the multitude of different

markers, some with inconsistent results, compromise its application in clinical practice and highlight the importance of establishing this theme as a research priority.

Statement of Ethics

This research did not involve human participants or animals as this was a systematic review of existing publications, and no primary data were collected. Written informed consent was, therefore, not obtained, and ethical approval was not sought.

Conflict of Interest Statement

Dr. Pontes-Neto received research support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 402388/2013-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2016/15236-8), and CAPES (402388/2013-5). The other authors declare no conflicts of interest.

Funding Sources

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Author Contributions

R.K.M.F., M.C.Z., and G.R. carried out the literature search and drafted the manuscript. O.P.N. critically revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- 1 Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2019;18(7):684–96.
- 2 Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):689–701.
- 3 Mok V, Wong A, Tang WK, Lam WW, Fan YH, Richards PS, et al. Determinants of pre-stroke cognitive impairment in stroke associated with small vessel disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005;20(4):225–30.
- 4 Huisa BN, Caprihan A, Thompson J, Prestopnik J, Qualls CR, Rosenberg GA. Long-term blood-brain barrier permeability changes in Binswanger disease. *Stroke*. 2015 Sep;46(9):2413–8.
- 5 Shibata M, Yamada S, Kumar Ram S, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):1489–99.
- 6 Zlokovic BV, Yamada S, Holtzman D, Ghiso J, Frangione B. Clearance of amyloid beta-peptide from brain: transport or metabolism? *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):718–9.
- 7 Snyder HM, Corriveau RA, Craft S, Faber JE, Greenberg SM, Knopman D, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2015 Jun;11(6):710–7.
- 8 Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009 Jul;6(7):e1000097.
- 9 Janelidze S, Hertze J, Nägga K, Nilsson K, Nilsson C, Wennstrom M, et al. Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype. *Neurobiol Aging*. 2017;51(2017):104–12.
- 10 Skoog I. Risk factors for vascular dementia: a review. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1994; 5(3–4):137–44.
- 11 Carantoni M, Zuliani G, Munari MR, D'Elia K, Palmieri E, Fellin R. Alzheimer disease and vascular dementia: relationships with fasting glucose and insulin levels. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2000;11(3):176–80.
- 12 Hao J, Sing K, Yan Y, Hui J, Ding D, Hong Z. Plasma level of sICAM-1 is associated with the extent of white matter lesion among asymptomatic elderly subjects. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111:847–51.

- 13 Zuliani G, Cavalieri M, Galvani M, Passaro A, Munari MR, Bosi C, et al. Markers of endothelial dysfunction in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2008;272(1-2):164-70.
- 14 Staszewski J, Piusińska-Macoch R, Brodacki B, Skrobowska E, Stepień A. IL-6, PF-4, sCD40 L, and homocysteine are associated with the radiological progression of cerebral small-vessel disease: a 2-year follow-up study. *Clin Interv Aging.* 2018;13:1135-41.
- 15 Dias HKI, Brown CLR, Polidori MC, Lip GYH, Griffiths HR. LDL-lipids from patients with hypercholesterolaemia and Alzheimer's disease are inflammatory to microvascular endothelial cells: mitigation by statin intervention. *Clin Sci.* 2015;129(12):1195-206.
- 16 Miralbell J, López-Cancio E, López-Oloriz J, Arenillas JF, Barrios M, Soriano-Raya JJ, et al. Cognitive patterns in relation to biomarkers of cerebrovascular disease and vascular risk factors. *Cerebrovasc Dis.* 2013;36(2):98.
- 17 Holm H, Nagga K, Nilsson ED, Ricci F, Melander O, Hansson O, et al. Biomarkers of microvascular endothelial dysfunction predict incident dementia: a population-based prospective study. *J Intern Med.* 2017;282(1):94-101.
- 18 Qiang G, Wenzhai C, Huan Z, Yuxia Z, Dongdong Y, Sen Z, et al. Effect of Sanchijiangtang on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in patients with type 2 diabetes mellitus and vascular dementia: a single-blind randomized controlled trial. *J Tradit Chin Med.* 2015 Aug;35(4):375-80.
- 19 Pikula A, Böger RH, Beiser AS, Maas R, DeCarli C, Schwedhelm E, et al. Association of plasma ADMA Levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham offspring study. *Stroke.* 2009;40(9):2959-64.
- 20 Pelzer N, Bijkerk R, Reinders MEJ, van Zonneveld AJ, Ferrari MD, van den Maagdenberg AMJM, et al. Circulating endothelial markers in retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations. *Stroke.* 2017;48(12):3301-7.
- 21 Stott DJ, Spilg E, Campbell AM, Rumley A, Mansoor MA, Lowe GD. Haemostasis in ischaemic stroke and vascular dementia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2001;12(8):651-7.
- 22 Briani C, Cagnin A, Gallo L, Toffanin E, Vargnolino M, Zaninotto M, et al. Anti-heparan sulphate antibodies and homocysteine in dementia: markers of vascular pathology? *J Neurol Sci.* 2005;229-30:215-8.
- 23 Lin JX, Tomimoto H, Akiguchi I, Matsuo A, Wakita H, Shibasaki H, et al. Vascular cell components of the medullary arteries in Binswanger's disease brains: a morphometric and immunoelectron microscopic study. *Stroke.* 2000 Aug;31(8):1838-42.
- 24 Ashby EL, Kehoe PG, Love S. Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain Res.* 2010;1363:1-10.
- 25 Lemańska-Perek A, Leszek J, Krzyżanowska-Golab D, Radzik J, Katnik-Prastowska I. Molecular status of plasma fibronectin as an additional biomarker for assessment of Alzheimer's dementia risk. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;28(4):338-42.
- 26 Romanitan MO, Popescu BO, Spulber S, Băjenaru O, Popescu LM, Winblad B, et al. Altered expression of claudin family proteins in Alzheimer's disease and vascular dementia brains. *J Cell Mol Med.* 2010;14(5):1088-100.
- 27 Romanitan MO, Popescu BO, Winblad B, Băjenaru OA, Bogdanovic N. Occludin is overexpressed in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Cell Mol Med.* 2007;11(3):569-79.
- 28 Ke XJ, Zhang JJ. Changes in HIF-1 α , VEGF, NGF and BDNF levels in cerebrospinal fluid and their relationship with cognitive impairment in patients with cerebral infarction. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.* 2013;33(3):433-7.
- 29 Tarkowski E, Issa R, Sjögren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, et al. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging.* 2002;23(2):237-43.
- 30 Chakraborty A, Chatterjee M, Twaalfhoven H, Del Campo Milan M, Teunissen CE, Schelkens P, et al. Vascular endothelial growth factor remains unchanged in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimers Res Ther.* 2018;10(1):58-7.
- 31 Ahmed-Jushuf F, Jiwa NS, Arwani AS, Foot P, Bridges LR, Kalaria RN, et al. Age-dependent expression of VEGFR2 in deep brain arteries in small vessel disease, CADASIL, and healthy brains. *Neurobiol Aging.* 2016;42:110-5.
- 32 Solerte SB, Ferrari E, Cuzzoni G, Locatelli E, Giustina A, Zamboni M, et al. Decreased release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in Alzheimer's disease: recovering effect with insulin and DHEA sulfate. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005;19(1):1-10.
- 33 Kim Y, Nam YJ, Lee C. Haplotype analysis of single nucleotide polymorphisms in VEGF gene for vascular dementia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141B(4):332-5.
- 34 Hohman TJ, Bell SP, Jefferson AL. The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 2015;72(5):520-9.
- 35 Baloyannis SJ. Pathological alterations of the climbing fibres of the cerebellum in vascular dementia: a Golgi and electron microscope study. *J Neurol Sci.* 2007;257(1-2):56-61.
- 36 Burke MJ, Nelson L, Slade JY, Oakley AE, Khundakar AA, Kalaria RN. Morphometry of the hippocampal microvasculature in post-stroke and age-related dementias. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(3):284-95.
- 37 Barker R, Ashby EL, Wellington D, Barrow VM, Palmer JC, Kehoe PG, et al. Pathophysiology of white matter perfusion in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain.* 2014;137(Pt 5):1524-32.
- 38 Thomas T, Miners S, Love S. Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain.* 2015;138(Pt 4):1059-69.
- 39 Sinclair LI, Taylor HM, Love S. Synaptic protein levels altered in vascular dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41(4):533-43.
- 40 Babapoor-Farrokhran S, Jee K, Puchner B, Hassan SJ, Xin X, Rodrigues M, et al. Angiopoietin-like 4 is a potent angiogenic factor and a novel therapeutic target for patients with proliferative diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(23):E3030-9.
- 41 Chakraborty A, Kamermans A, van Het Hof B, Castricum K, Aanhane E, van Horssen J, et al. Angiopoietin like-4 as a novel vascular mediator in capillary cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2018;141(12):3377-88.
- 42 Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, et al. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Feb;207(2):807-12.
- 43 Palmer JC, Baig S, Kehoe PG, Love S. Endothelin-converting enzyme-2 is increased in Alzheimer's disease and up-regulated by Abeta. *Am J Pathol.* 2009;175(1):262-70.
- 44 Giwa MO, Williams J, Elderfield K, Jiwa NS, Bridges LR, Kalaria RN, et al. Neuropathologic evidence of endothelial changes in cerebral small vessel disease. *Neurology.* 2012;78(3):167-74.
- 45 Staszewski J, Skrobowska E, Piusińska-Macoch R, Brodacki B, Stepień A. Cerebral and extracerebral vasoreactivity in patients with different clinical manifestations of cerebral small-vessel disease: data from the significance of hemodynamic and hemostatic factors in the course of different manifestations of cerebral small-vessel disease study. *J Ultrasound Med.* 2019;38(4):975-87.
- 46 Migrino RQ, Truran S, Karamanova N, Serano GE, Madrigal C, Davies HA, et al. Human cerebral collateral arteriole function in subjects with normal cognition, mild cognitive impairment, and dementia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(2):H284-90.
- 47 Peters N, Freilinger T, Opherck C, Pfefferkorn T, Dichgans M. Enhanced L-arginine-induced vasoreactivity suggests endothelial dysfunction in CADASIL. *J Neurol.* 2008;255(8):1203-8.
- 48 de Boer I, Stam AH, Buntinx L, Zielman R, van der Steen I, van den Maagdenberg AMJM, et al. RVCL-S and CADASIL display distinct impaired vascular function. *Neurology.* 2018;91(10):e956-63.

- 49 Brennan-Krohn T, Salloway S, Correia S, Dong M, De La Monte SM. Glial vascular degeneration in CADASIL. *J Alzheimers Dis.* 2010;21(4):1393–402.
- 50 Craggs LJJ, Fenwick R, Oakley AE, Ihara M, Kalaria RN. Immunolocalization of platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) and pericytes in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41(4):557–70.
- 51 Tachibana H, Washida K, Kowa H, Kanda F, Toda T. Vascular function in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2016;31(5):437–42.
- 52 Moser DJ, Miller IN, Hoth KF, Correia M, Arndt S, Haynes WG. Vascular smooth muscle function is associated with initiation and processing speed in patients with atherosclerotic vascular disease. *J Int Neuropsychol Soc.* 2008;14(4):535–41.
- 53 Gomis M, Sobrino T, Ois A, Millán M, Rodriguez-Campello A, Pérez de la Ossa N, et al. Plasma beta-amyloid 1-40 is associated with the diffuse small vessel disease subtype. *Stroke.* 2009;40(10):3197–201.
- 54 Kong XD, Zhang Y, Liu L, Sun N, Zhang MY, Zhang JN. Endothelial progenitor cells with Alzheimer's disease. *Chin Med J.* 2011;124(6):901–6.
- 55 Nelson JW, Young JM, Borkar RN, Woltjer RL, Quinn JF, Silbert LC, et al. Role of soluble epoxide hydrolase in age-related vascular cognitive decline. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2014;113–5:30–7.
- 56 Duering M, Konieczny MJ, Tiedt S, Baykara E, Tuladhar AM, Leijssen EV, et al. Serum neurofilament light chain levels are related to small vessel disease burden. *J Stroke.* 2018; 20(2):228–38.

B) Artigo submetido para publicação na revista “*Cerebrovascular Diseases*” (Fator de Impacto: 3,1) (em revisão).

White matter hyperintensities and post-stroke apathy: a fully automated MRI segmentation study

Rui Kleber do Vale Martins-Filho, MD, MSc¹; Guilherme Riccioppo Rodrigues, MD, PhD¹; Raul Ferreira da Costa, MD¹; Rodrigo de Souza Castro, MD, MSc¹; Maria Clara Zanon Zotin, MD, MSc^{2,3}; Millene R. Camilo, MD, PhD¹; Octavio M. Pontes-Neto, MD, PhD¹

¹Department of Neurosciences and Behavioural Sciences, Hospital das Clínicas – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Department of Neurology, J. Philip Kistler Stroke Research Center, MGH, Boston, MA, USA

³Department of Medical Imaging, Hematology and Clinical Oncology, Ribeirão Preto Medical School, USP, SP, Brazil.

General information:

Short title (running head): White matter hyperintensities and apathy in stroke

Word count for the abstract: 202

Word count for the paper: 4155

References: 32

Tables: 4

Figures: 2

Keywords / search terms: apathy, cerebral small vessel disease, depression, MRI segmentation, Stroke, white matter disease.

Correspondence to:

Rui Kleber Martins-Filho, MD, MSc.

Unidade de Emergência - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP)

Rua Bernardino de Campos 1000, Centro, Ribeirão Preto/SP, CEP 14015-130, Brazil

Telephone/fax number: +55 (16) 3602-1147

E-mail: ruikleber@usp.br

Abstract

Introduction: Post-stroke apathy (PSA) is a common neuropsychiatric disorder that may affect up to 30% of stroke patients. Despite the difficulties of investigating this condition (overlapping with depression, heterogeneity of diagnostic criteria, a small number of studies), some recent diffusion tensor imaging studies have suggested that widespread microstructural white matter (WM) disruption plays a key role in the development of PSA. Therefore, we intended to investigate this hypothesis by evaluating the relationship between WM hyperintensities (WMH) and apathy in patients with cerebrovascular disease. **Methods:** We studied patients with apathy (n = 12), depression (n = 21), and controls (n = 24) and investigated the predictors of WMH, measured by an automated brain MRI segmentation software. In addition, we carried out correlation analyses between Neuropsychiatric Inventory-Apathy (NPI-A), Neuropsychiatric Inventory-Depression (NPI-D), and WMH. **Results:** The overall prevalence of PSA was 21%. Apathetic and depressed patients presented a higher volume of WMH. Mini-mental state examination (MMSE) and NPI-A were the only predictors for WMH. Conversely, NPI-D did not correlate to WMH. **Discussion/Conclusion:** This study supports the view of PSA as a distinct syndrome mediated by diffuse white matter hyperintensities, suggesting that WM disruption is an important pathway to the development of apathy in stroke patients.

Introduction

Post-stroke apathy (PSA) is a common neuropsychiatric disorder that may affect up to 30% of stroke patients after the first episode [1]. Apathy is defined as a loss of motivation, manifesting as reduced goal-directed behavior, goal-directed cognition, or diminished emotion [2]. This syndrome contributes to significant impairment in multiple areas of functioning, compromising rehabilitation and overall quality of life of stroke patients [3,4].

While PSA is different from post-stroke depression (PSD), depression is commonly associated with loss of motivation, making PSA diagnosis even more complex and frequently overlooked [5]. Furthermore, the small number of available studies, and their different methodological approaches, especially concerning the criteria used for diagnosing apathy, has led to conflicting data [6].

Recent magnetic resonance imaging (MRI) studies involving diffusion tensor imaging (DTI) techniques have linked white matter (WM) microstructural disruption to apathy pathogenesis, suggesting that generalized brain damage may play a more prominent role than regional injury in this process [3,7,8]. These findings support the notion that progressive and cumulative subcortical vascular lesions may contribute to PSA by causing a disconnection syndrome. Cerebral small vessel disease (cSVD) lesions, such as white matter hyperintensities (WMH) and lacunar infarcts, could disrupt specific WM pathways involved in cognition, emotion, and behavior, contributing to apathetic manifestations. Although more accurate to detect microstructural WM changes, DTI techniques are not widely available in the clinical setting, prompting the need to investigate WMH on conventional MRI sequences to identify this relationship.

While previous studies based on visual rating scales have provided controversial results [9,10], we investigated whether the increased burden of WMH evaluated by an automated brain MRI software could represent a relevant risk factor for PSA. We hypothesized that a higher global volume of WMH would be related to PSA, supporting the concept that WM injury plays a relevant role in the development of apathetic symptoms in this population.

Methods

Participant selection and study design

We evaluated consecutively 57 patients from two stroke clinics in Brazil (HC-FMRP/USP and HSH/GYN) between June 2017 and August 2018. We included patients older than 18 years old with a history of at least one stroke or suspected vascular cognitive impairment, with no severe dementia (i.e., Clinical Dementia Rating = 3) or severe visual, motor, or language deficits. We excluded patients using antipsychotics or benzodiazepines, unlettered, and those with neurodegenerative diseases. Demographic and clinical variables included gender, age, level of education, hypertension, diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, cardiopathy, smoking status, history of previous depression, NIHSS, Mini Mental State Examination (MMSE) (represented by z-scores controlled for education), Neuropsychiatric Inventory-version Apathy (NPI-A), and Neuropsychiatric Inventory-version Dysphoria/Depression (NPI-D), as reported in Table 1.

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents

The ethics committee of both institutions approved this study. All patients provided written informed consent. More information in Statement of Ethics section.

Measures

We diagnosed apathy using proposed consensus criteria [11] and measured apathetic symptoms using the Neuropsychiatric Inventory-Apathy (NPI-A) [12]. Depressive symptoms were measured with the Neuropsychiatric Inventory-D (NPI-D) [12], and depression was diagnosed using DSM-IV criteria [13]. We divided the patients into three groups: apathy, depression, and controls.

Cognitive impairment was investigated among the study participants using MMSE [14], and severity of stroke was measured by National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) [15].

MRI acquisition parameters

Participants underwent brain MRI either on a 3-Tesla Achieva scanner (Philips Healthcare, Best, Netherlands) at the “Clinics Hospital of Ribeirao Preto Medical School”, using a 32-channel head coil, or on a 1.5T scanner at the “Santa Helena Hospital”. All scans were performed within 3 months of the stroke.

The 3T MRI protocol included: a T1-weighted sequence (repetition time (TR), 7.29 ms; echo time (TE), 3.40 ms; slice thickness, 1; in plane, 1×1 mm), a T2-weighted sequence (TR: 5527 ms; TE: 80 ms, slice thickness, 5 mm; in-plane, 0.41×0.41 mm), a fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR - TR, 5000 ms; TE, 328 ms; slice thickness, 1 mm; in-plane, 0.6×0.6 mm), and a susceptibility-weighted imaging (SWI - TR, 14.4 ms; TE, 20 ms; slice thickness, 4 mm; in-plane, 0.42×0.42 mm). The 1.5T MRI protocol included: a T1-weighted sequence (sagittal, TR, 464 ms; TE, 12 ms; slice thickness, 5; in-plane resolution, 0.32×0.32 mm), a T2-weighted sequence (axial, TR: 3700 ms; TE: 90 ms, slice thickness, 5.5 mm; in-plane, 0.28×0.28 mm), a FLAIR (axial - TR, 10000 ms; TE, 105 ms; slice thickness, 5.5 mm; in-plane resolution, 0.37×0.37 mm), and a gradient-echo T2*-weighted sequence (axial – TR, 746 ms; TE, 25 ms; slice thickness, 5.5 mm; in-plane resolution, 0.47×0.47 mm).

Radiologic markers

An independent neurologist blinded to the clinical data analyzed the MRI scans and rated the images according to medial temporal lobe atrophy score (MTA) [16], posterior atrophy score [17], the number of cerebral microbleeds (CMBs), and the presence of lacunes of presumed vascular origin in a dichotomic fashion, following the STRIVE nomenclature and definitions [18]. Deep and lobar enlarged perivascular spaces (EPVS) were coded with the following scale

applied to standard axial images: 0 = no EPVS, 1 = < 10 EPVS, 2 = 11 to 20 EPVS, 3 = 21 to 40 EPVS, and 4 \geq 40 EPVS [19]. We summed deep and lobar EPVS scores to form a total of 8 (0 to 8).

All images were pre-evaluated for the presence of large artery infarctions (non-lacunar strokes), which could be a confounder for WMH segmentation. We defined this condition as distinct lesions greater than 15mm on the FLAIR sequence.

Automated WMH segmentation

The volBrain is a set of imaging processing tasks that improve the input images into specific geometric and intensity spaces to segment the structures of interest based on a sequence of preprocessing steps and estimation of different brain volumes at different scales. It has its own proposed pipeline through a web interface (<http://volbrain.upv.es>) that dispenses with any installation, configuration, or training. Its volumetric analysis works through this interface using a SaaS (Software as a Service) model to automatically provide a report containing volumetric data from any uploaded case. The segmentation pipeline is executed on a dedicated cluster running Windows Server 2012 R2 Datacenter using a Matlab compiled version of their pipeline, producing a pdf report with the volumes of the main intracranial cavity tissues (cerebral spinal fluid, gray matter, and WM) [20]. Furthermore, this system provides a specific pipeline focused on WM lesions (lesionBrain), providing the measurement of global WMH. It was validated across state-of-the-art methods at the International Workshop on Patch-based Techniques in Medical Imaging (MICCAI) Challenge 2016 dataset based on the consensus of seven experts through images processed in three different scanners (Philips Ingenia 3T, Siemens Aera 1.5T, and Siemens Verio 3T) [21].

Besides total WMH volume, the software estimates the intracranial and brain parenchymal volume, providing a measure of global brain atrophy (GBA) represented as a ratio between these two parameters [20].

After the processing results, all reports were double-checked by a blinded reviewer.

The main imaging parameters according to each group are represented in Table 2.

Statistical Analyses

We presented descriptive statistics as mean and standard deviation (+/- SD) for continuous variables with normal distribution and as median and interquartile ranges (+/-IQR) for those with non-normal distributions, according to the Shapiro-Wilk test for normality. In addition, we described categorical variables as frequencies.

We investigated the clinical, demographic, and imaging variables (tables 1 and 2) between the three groups (apathy, depression, and controls) performing the non-parametric Kruskal-Wallis test plus Dunn test for post-hoc analysis. We carried out the chi-square and Fisher tests to assess associations between categorical variables. The level of significance was adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni method for a p-value set at 0.05 (two-tailed).

We built a stepwise multiple linear regression model (backward) to predict the volume of total WMH, including as covariates the variables with $P < 0.1$ in univariate analysis (GBA, MTA, NPI-A, NPI-D) in addition to traditional factors associated with WMH (age, hypertension, gender, MMSE).

Next, we carried out a correlation test (Spearman) to investigate the association between WMH with NPI-A and NPI-D, respectively.

The analyses were made by the R software, version 4.0.4.

Results

There were no significant differences regarding clinical and demographic characteristics between the three groups (depression, apathy, and controls). The overall prevalence of apathy in our subjects was 21%.

Compared to the control group, both apathetic and depressed patients presented a higher volume of WMH (fig. 1).

In the multivariable analysis, only MMSE and apathy (measured by the NPI-A) were independent factors for predicting the total volume of WMH (table 3).

There was a moderate correlation between NPI-A and WMH ($\rho = .50$, $p < .001$), while there was no correlation between NPI-D and WMH ($\rho = 0.16$, $p = 0.11$). The results are presented in Table 4 and Figure 2.

Discussion

The prevalence of apathy in stroke patients is variable in the literature, but previous meta-analyses have demonstrated rates between 30-40% [6]. In our study, 21% of the subjects were apathetic, indicating a lower prevalence, which might be justified by the strict method used to diagnose apathy and classify the groups. Since it is very difficult to diagnose depression without some degree of loss of motivation [22], and because stroke patients tend to develop either apathy or depression with a minority developing both syndromes [23], we chose not to establish a comorbid group. Some previous studies have not applied the same diagnostic revised criteria, rather using cutoffs derived from depression and apathy scales. We believe this approach may overestimate the comorbid status, making it even more challenging to address this relationship. In the past, many studies have tried to untangle these two conditions, presenting inconclusive

results [24, 25, 26]. Our study defined apathy as a unique and independent entity, avoiding the influence of depression with apathetic symptoms in our analysis, for the two syndromes seem to benefit from different pharmacological therapies and probably present different underlying mechanisms.

The application in the clinical practice of imaging markers to improve the diagnosis and understanding of these syndromes has been evolving in the last years with the progress of MRI techniques and the better comprehension of the role of cSVD markers in various neurological disorders. In fact, the vascular theory of apathy establishes the widespread cerebrovascular damage caused by the cSVD spectrum as the pathological basis for the syndrome. Recent studies with cSVD and stroke patients agree with this hypothesis [27]. First, Douven et al. (2020) showed that GBA and severe cSVD burden lesions, presented as a composite score of the main cSVD markers, were significantly associated with PSA's odds, suggesting a generalized degenerative and vascular brain pathology in these patients. In this case, depression was also associated with a moderate cSVD burden [28]. In another study, Tay et al. (2019) investigated white matter network disruption in cSVD patients using diffusion tensor imaging. In this cohort of patients, apathy, but not depression, was associated with white matter tract disconnection, mainly involving subnetworks related to action initiation and effort-based decision making [7]. Recently, Zhao et al. associated cSVD burden with apathy, but not depression, in elderly cSVD subjects [29].

From our knowledge, this is the first study to identify the association between the volume of widespread white matter hyperintensities derived from an automated segmentation software and post-stroke apathetic symptoms. We found the volume of segmented WMH to be the only imaging marker related to NPI-A in our cohort. We did not identify an association between other cSVD markers and apathetic symptoms, probably due to the study's small sample size.

Conversely, symptoms of depression measured by NPI-D were not related to WMH, which supports the view that PSA is a unique entity with different and singular pathogenesis in compared to depression.

Further research delving into this relationship is warranted, mainly involving longitudinal designs, with larger populations of patients with apathy controlled for the presence of depression.

Gender is another important aspect regarding the manifestation of WMH and its dynamics. Previous studies have shown a higher degree in the severity and the progression of WMH among women than men, suggesting gender-related differences may play an important role in the pathogenesis of WMH [30, 31]. Our model, however, has not shown a significant effect of gender in predicting WMH. Furthermore, these studies have been developed among large populations of asymptomatic men and women, whilst the latest results have shown no gender-related difference in the WMH progression in a sample of subjects with minor stroke followed for two years [32]. Our dataset was composed primarily of low-severity strokes, which appear to align with these findings.

Our study has some limitations. First, we worked with a relatively small sample, which may have compromised our model by overfitting, although its results align with other studies in this field. Second, it undermined the possibility of investigating other cSVD markers. Also, the transversal nature of our research made a temporal analysis between the progression of WMH and the severity of apathy symptoms not possible. As for strengths, we highlight the application of an automated MRI software in the analysis, which improved the evaluation of WMH and avoided the inter-reliability issues involving visual scales. Besides, we worked with conventional and widely available MRI sequences. We stress the methodological utility of identifying a distinctive group of pure apathetic patients in the initial dataset of the study,

avoiding confusion with comorbid depression. Besides, we defined apathy through clinician diagnosis (the guidelines of Robert et al. for apathy and DSM-IV), providing a different perspective from current literature, which typically measures these constructs using self-report scales alone.

Conclusions

This study supports the view of PSA as a distinct syndrome mediated by diffuse white matter hyperintensities, suggesting that WM disruption is an important pathway to the development of apathy in stroke patients.

Statements

Statement of Ethics

All the authors state that all the subjects (or their guardians) have given their written informed consent and that the study protocol was approved by the Medical Ethics Committee of Santa Helena Hospital and Clinics Hospital of Ribeirão Preto Medical School, approval number 2.077.012.

Conflicts of Interest Statement

Dr. Pontes-Neto received research support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 402388/2013-5); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2016/15236-8) and CAPES (402388/2013-5).

The other authors declare no conflicts of interest.

Funding Sources

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Author Contributions

Rodrigo de Souza Castro: patient recruitment; Raul Ferreira da Costa: data acquisition; Rui Kleber do Vale Martins-Filho, Guilherme Riccioppo Rodrigues: data analysis; Rui Kleber do Vale Martins-Filho: manuscript writing; Guilherme Riccioppo Rodrigues, Rui Kleber do Vale Martins-Filho: conception, study design; Maria Clara Zanon Zotin, Guilherme Riccioppo Rodrigues, Millene R. Camilo, Octavio M. Pontes-Neto: manuscript revision.

Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

References

1. Hackett ML, Köhler S, O'Brien JT, Mead GE. Neuropsychiatric outcomes of stroke [Internet]. Vol. 13, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2014 [cited 2021 Jan 16]. p. 525–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24685278/>
2. Moretti R, Signori R. Neural correlates for apathy: Frontal-prefrontal and parietal cortical- subcortical circuits [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2016 [cited 2021 Jan 16]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28018207/>
3. Hollocks MJ, Lawrence AJ, Brookes RL, Barrick TR, Morris RG, Husain M, et al. Differential relationships between apathy and depression with white matter microstructural changes and functional outcomes. *Brain* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited

- 2021 Jan 16];138(12):3803–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26490330/>
4. Van Dalen JW, Van Wanrooij LL, Moll Van Charante EP, Brayne C, Van Gool WA, Richard E. Association of Apathy with Risk of Incident Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Jan 16];75(10):1012–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30027214/>
 5. Douven E, Köhler S, Rodriguez MMF, Staals J, Verhey FRJ, Aalten P. Imaging Markers of Post-Stroke Depression and Apathy: a Systematic Review and Meta-Analysis [Internet]. Vol. 27, *Neuropsychology Review*. Springer New York LLC; 2017 [cited 2021 Jan 16]. p. 202–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28831649/>
 6. Van Dalen JW, Van Charante EPM, Nederkoorn PJ, Van Gool WA, Richard E. Poststroke apathy. *Stroke* [Internet]. 2013 Mar [cited 2021 Apr 4];44(3):851–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23362076/>
 7. Tay J, Tuladhar AM, Hollocks MJ, Brookes RL, Tozer DJ, Barrick TR, et al. Apathy is associated with large-scale white matter network disruption in small vessel disease. *Neurology* [Internet]. 2019 Mar 12 [cited 2021 Jan 16];92(11):E1157–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30737341/>
 8. Hahn C, Lim HK, Won WY, Ahn KJ, Jung WS, Lee CU. Apathy and White Matter Integrity in Alzheimer’s Disease: A Whole Brain Analysis with Tract-Based Spatial Statistics. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan 3 [cited 2021 Apr 4];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23301077/>
 9. Brodaty H, Sachdev PS, Withhall A, Altendorf A, Valenzuela MJ, Lorentz L. Frequency and clinical, neuropsychological and neuroimaging correlates of apathy following stroke - The Sydney Stroke Study. *Psychol Med* [Internet]. 2005 Dec [cited 2021 Apr

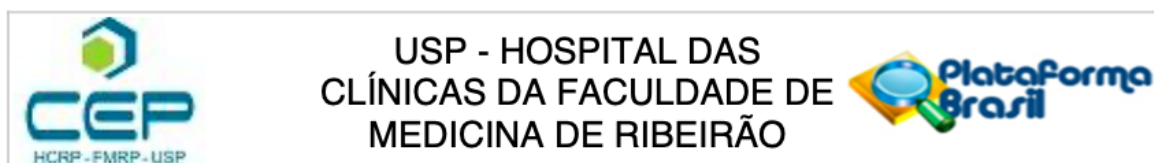
- 4];35(12):1707–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16202190/>
10. Tang WK, Chen YK, Liang HJ, Chu WCW, Mok VCT, Ungvari GS, et al. Location of infarcts and apathy in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Apr 4];35(6):566–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838825/>
 11. Robert P, Onyike CU, Leentjens AFG, Dujardin K, Aalten P, Starkstein S, et al. Proposed diagnostic criteria for apathy in Alzheimer’s disease and other neuropsychiatric disorders. *Eur Psychiatry* [Internet]. 2009 Mar [cited 2021 Jan 16];24(2):98–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19201579/>
 12. Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. The neuropsychiatric inventory: Comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* [Internet]. 1994 [cited 2021 Jan 16];44(12):2308–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7991117/>
 13. Trull TJ, Vergés A, Wood PK, Jahng S, Sher KJ. The structure of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th edition, text revision) personality disorder symptoms in a large national sample. *Personal Disord Theory, Res Treat* [Internet]. 2012 Oct [cited 2021 Apr 4];3(4):355–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22506626/>
 14. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* [Internet]. 1975 [cited 2021 Jan 16];12(3):189–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1202204/>
 15. Lyden P, Raman R, Liu L, Emr M, Warren M, Marler J. National institutes of health stroke scale certification is reliable across multiple venues. *Stroke* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2022 Mar 26];40(7):2507–11. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19520998/>
16. Scheltens P, Kuiper M, Ch Wolters E, Barkhof F, Valk J, Weinstein HC, et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in “probable” Alzheimer’s disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1992 [cited 2021 Apr 4];55(10):967–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1431963/>
 17. Koedam ELGE, Lehmann M, Van Der Flier WM, Scheltens P, Pijnenburg YAL, Fox N, et al. Visual assessment of posterior atrophy development of a MRI rating scale. *Eur Radiol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Apr 4];21(12):2618–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21805370/>
 18. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2018 May 7];12(8):822–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867200>
 19. Doubal FN, MacLulich AMJ, Ferguson KJ, Dennis MS, Wardlaw JM. Enlarged Perivascular Spaces on MRI Are a Feature of Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* [Internet]. 2010 Mar [cited 2021 Apr 4];41(3):450–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056930/>
 20. Manjón J V., Coupé P. Volbrain: An online MRI brain volumetry system. *Front Neuroinform* [Internet]. 2016 Jul 27 [cited 2021 Jan 16];10(JUL). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27512372/>
 21. Pierrick Coupé, Thomas Tourdias, Pierre Linck, Jose Romero, Jose Manjon. LesionBrain: An Online Tool for White Matter Lesion Segmentation. *International Workshop on Patch-based Techniques in Medical Imaging (MICCAI)*, Sep 2018, Grenade, Spain. pp.95 - 103, 10.1007/978-3-030-00500-9_11 . hal-01918438

22. Cummings J, Friedman JH, Garibaldi G, Jones M, Macfadden W, Marsh L, et al. Apathy in Neurodegenerative Diseases: Recommendations on the Design of Clinical Trials. *J Geriatr Psychiatry Neurol* [Internet]. 2015 Sep 24 [cited 2022 Mar 26];28(3):159–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25809634/>
23. Tay J, Morris RG, Markus HS. Apathy after stroke: Diagnosis, mechanisms, consequences, and treatment [Internet]. Vol. 16, *International Journal of Stroke*. *Int J Stroke*; 2021 [cited 2022 Mar 26]. p. 510–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33527880/>
24. Lopatkiewicz AM, Pera J, Slowik A, Dziedzic T. Early apathetic, but not depressive, symptoms are associated with poor outcome after stroke. *Eur J Neurol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Apr 4]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33619849/>
25. Sachdev PS. Post-Stroke Cognitive Impairment, Depression and Apathy: Untangling the Relationship [Internet]. Vol. 26, *American Journal of Geriatric Psychiatry*. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2021 Jan 17]. p. 301–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29325929/>
26. Manning KJ, Taylor WD. Poststroke Depression and Apathy: Why Should We Care? [Internet]. Vol. 28, *American Journal of Geriatric Psychiatry*. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2021 Apr 4]. p. 1210–2. Available from: <http://www.ajgponline.org/article/S1064748120302578/fulltext>
27. Wouts L, van Kessel M, Beekman ATF, Marijnissen RM, Oude Voshaar RC. Empirical support for the vascular apathy hypothesis: A structured review [Internet]. Vol. 35, *International Journal of Geriatric Psychiatry*. John Wiley and Sons Ltd; 2020 [cited 2021 Jan 17]. p. 3–11. Available from: </pmc/articles/PMC6916153/?report=abstract>
28. Douven E, Staals J, Freeze WM, Schievink SHJ, Hellebrekers DMJ, Wolz R, et al. Imaging markers associated with the development of post-stroke depression and apathy: Results of the Cognition and Affect after Stroke – a Prospective Evaluation of Risks

- study. *Eur Stroke J* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Jan 17];5(1):78–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32232173/>
29. Zhào H, Liu Y, Xia Z, Xie H, Huang Y. Diagnosis and Assessment of Apathy in Elderly Chinese Patients With Cerebral Small Vessel Disease. *Front Psychiatry*. 2021 Aug 3;12:1305.
 30. Van Den Heuvel DMJ, Admiraal-Behloul F, Ten Dam VH, Olofsen H, Bollen ELEM, Murray HM, et al. Different progression rates for deep white matter hyperintensities in elderly men and women. *Neurology* [Internet]. 2004 Nov 9 [cited 2022 Mar 27];63(9):1699–701. Available from: <https://n.neurology.org/content/63/9/1699>
 31. Fatemi F, Kantarci K, Graff-Radford J, Preboske GM, Weigand SD, Przybelski SA, et al. Sex differences in cerebrovascular pathologies on FLAIR in cognitively unimpaired elderly. *Neurology* [Internet]. 2018 Feb 6 [cited 2022 Mar 27];90(6):e466–73. Available from: [/pmc/articles/PMC5818016/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111116/)
 32. Jiang J, Yao K, Huang X, Zhang Y, Shen F, Weng S. Longitudinal white matter hyperintensity changes and cognitive decline in patients with minor stroke. *Aging Clin Exp Res* [Internet]. 2022 Jan 27 [cited 2022 Mar 27];1–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40520-021-02024-5>

C) Certificado de aprovação do comitê de ética em pesquisa do HCFMRP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MARCADORES DE DECLÍNIO COGNITIVO EM PACIENTES COM DOENÇA CEREBRAL DE PEQUENOS VASOS

Pesquisador: Octavio Marques Pontes Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09825019.2.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1286648.pdf	23/04/2019 12:26:09		Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	23/04/2019 12:24:11	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEV2.docx	16/04/2019 19:39:59	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MarcadoresCCVABRIL2019V2.docx	16/04/2019 19:39:44	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	18/03/2019 20:03:33	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MarcadoresCCVMAR2019.docx	18/03/2019 20:03:23	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	16/02/2019 12:26:15	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	16/02/2019 12:25:27	Rui Kleber do Vale Martins Filho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 07 de Maio de 2019

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador(a))

D) MoCA: Montreal Cognitive Assessment

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA) Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
 Versão Experimental Brasileira Escolaridade: _____ Data de avaliação: ____/____/____
 Sexo: _____ Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		Copiar o cubo		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos		
				<input type="checkbox"/> Contorno <input type="checkbox"/> Números <input type="checkbox"/> Ponteiros		___/5		
NOMEAÇÃO								
						___/3		
MEMÓRIA								
Leia a lista de palavras, O sujeito de repeti-la, faça duas tentativas Evocar após 5 minutos			Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	Sem Pontuação
1ª tentativa								
2ª tentativa								
ATENÇÃO								
Leia a sequência de números (1 número por segundo)		O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta		<input type="checkbox"/> 2 1 8 5 4		___/2		
		O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta		<input type="checkbox"/> 7 4 2				
Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros.		<input type="checkbox"/> F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				___/1		
Subtração de 7 começando pelo 100		<input type="checkbox"/> 93	<input type="checkbox"/> 86	<input type="checkbox"/> 79	<input type="checkbox"/> 72	<input type="checkbox"/> 65	___/3	
4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto								
LINGUAGEM								
Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje.		<input type="checkbox"/>		O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala.		<input type="checkbox"/>	___/2	
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto).		<input type="checkbox"/> _____ (N ≥ 11 palavras)				___/1		
ABSTRAÇÃO								
Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta		<input type="checkbox"/> trem - bicicleta		<input type="checkbox"/> relógio - régua		___/2		
EVOCAÇÃO TARDIA								
Deve recordar as palavras SEM PISTAS		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS	
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
OPCIONAL								
Pista de categoria								
Pista de múltipla escolha								
ORIENTAÇÃO								
<input type="checkbox"/> Dia do mês		<input type="checkbox"/> Mês	<input type="checkbox"/> Ano	<input type="checkbox"/> Dia da semana	<input type="checkbox"/> Lugar	<input type="checkbox"/> Cidade	___/6	
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman (UNIFESP-SP 2007)						TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade	___/30	

E) Escala de atividades básicas de vida diária (Katz et al., 1963)

Atividade	SIM	NÃO
BANHO – Sem ajuda ou apenas para uma parte do corpo		
VESTIR – Sem ajuda ou apenas para amarrar o sapato		
TOALETE – Arruma-se sem ajuda		
MOBILIDADE – Sai da cama ou da cadeira sem ajuda		
CONTINÊNCIA – Controla a micção e a evacuação, raros acidentes		
ALIMENTAÇÃO – Sem ajuda ou apenas para cortar a carne		
Índice de Katz (= no. de tarefas em que é dependente):		

Disponível em: <https://neurovascular.fmrp.usp.br/avaliacao-da-funcionalidade-2/>

F) Escala de atividades instrumentais de vida diária (Lawton, Brody, 1969)

Atividade	SIM	NÃO
TELEFONE – Capaz de falar, mesmo que não memorize números		
COMPRAS – Realiza todas as compras necessárias de forma sozinho		
REFEIÇÕES – prepara a própria comida sem ajuda		
TRABALHO DOMÉSTICO – consegue manter, apenas precisando de ajuda para trabalho pesado		
LAVAR ROUPA – Lava ao menos pequenas peças de roupa		
LOCOMOÇÃO – Se desloca sozinho de carro ou taxi		
MEDICAÇÕES – Toma na hora e dose correta		
DINHEIRO – lembra de pagar as contas, precisa de auxílio apenas para preencher cheques		

Índice de Lawton (= no. de tarefas em que é dependente):

Disponível em: <https://neurovascular.fmrp.usp.br/avaliacao-da-funcionalidade-2/>

G) Escala visual de avaliação de microangiopatia (hipersinal de substância branca)

(Fazekas et al., 1987)

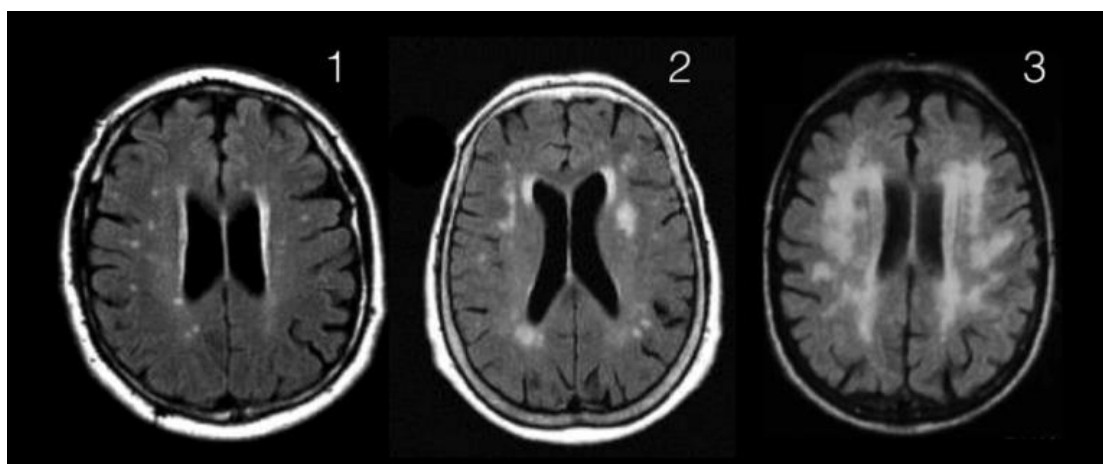
Método utilizado para avaliação do grau de lesões de substância branca visíveis na RM (FLAIR), conforme os seguintes graus:

Grau 0: ausente.

Grau 1: Focos esparsos menores que 10 mm. Áreas de lesões confluentes menores que 20 mm em diâmetro.

Grau 2: Confluência inicial: lesões únicas entre 10 e 20 mm e áreas de lesões agrupadas com mais de 20 mm de diâmetro.

Grau 3: Amplas áreas de confluência, com lesões únicas maiores que 20 mm de diâmetro.



Disponível em: <https://neurovascular.fmrp.usp.br/avaliacao-de-neuroimagem/>

H) Critérios modificados de Boston para Angiopatia Amilóide (AA)

Table 1. Modified Boston Criteria for CAA

Definite CAA
Full postmortem examination demonstrating:
Lobar, cortical, or cortical–subcortical hemorrhage
Severe CAA with vasculopathy
Absence of other diagnostic lesion
Probable CAA with supporting pathology
Clinical data and pathological tissue (evacuated hematoma or cortical biopsy) demonstrating:
Lobar, cortical, or cortical–subcortical hemorrhage (including ICH, CMB, or cSS)
Some degree of CAA in specimen
Absence of other diagnostic lesion
Probable CAA
Clinical data and MRI or CT demonstrating:
Multiple hemorrhages (ICH, CMB) restricted to lobar, cortical, or cortical–subcortical regions (cerebellar hemorrhage allowed), or single lobar, cortical, or cortical–subcortical hemorrhage and cSS (focal or disseminated)
Age ≥ 55 y
Absence of other cause of hemorrhage*
Possible CAA
Clinical data and MRI or CT demonstrating:
Single lobar, cortical, or cortical–subcortical ICH, CMB, or cSS (focal or disseminated)
Age ≥ 55 y
Absence of other cause of hemorrhage*

CAA indicates cerebral amyloid angiopathy; CMB, cerebral microbleed; cSS, cortical superficial siderosis; CT, computed tomography; ICH, intracerebral hemorrhage; and MRI, magnetic resonance imaging.

*Other causes of hemorrhage (differential diagnosis of lobar hemorrhages): antecedent head trauma, hemorrhagic transformation of an ischemic stroke, arteriovenous malformation, hemorrhagic tumor, warfarin therapy with international normalization ratio >3 , and vasculitis.

Adaptado de Greenberg, Charidimou, 2018 (Stroke)

I) T-MoCA: Ferramenta utilizada para rastreamento cognitivo por telefone no grupo controle.

> [Alzheimers Dement \(Amst\)](#). 2021 Feb 5;13(1):e12144. doi: 10.1002/dad2.12144. eCollection 2021.

T-MoCA: A valid phone screen for cognitive impairment in diverse community samples

Mindy J Katz ¹, Cuiling Wang ², Caroline O Nester ³, Carol A Derby ^{1 2}, Molly E Zimmerman ⁴, Richard B Lipton ^{1 2 5}, Martin J Sliwinski ⁶, Laura A Rabin ^{1 3}

Affiliations + expand

PMID: 33598528 PMCID: [PMC7864219](#) DOI: [10.1002/dad2.12144](#)

Free PMC article

Instruções de aplicação disponíveis em: <https://mocatest.org/remote-moca-testing/>

J) Ficha de indivíduos saudáveis

CONTROLES

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

- 1) Você tem conhecimento de diagnóstico de doença crônica? Por ex.: HAS, DM2, hipotireoidismo
- 2) Você toma algum remédio de uso contínuo?
- 3) Já foi submetido a alguma cirurgia?
- 4) Já recebeu tratamento prévio com medicações especiais? Por ex.: imunossupressor, anti-neoplásico
- 5) Nas últimas 2 semanas, você teve algum sintoma de doença aguda ou infecção?
- 6) Nas últimas 2 semanas, você passou por alterações de sono ou humor?
- 7) Nas últimas 2 semanas, você fez exercício físico extenuante?
- 8) Nas últimas 2 semanas, como você considera seu estado de saúde:

A melhor saúde que você pode imaginar 100

95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
A pior saúde que você pode imaginar 0

