

ESTUDIO DE LA RIGIDEZ ARTERIAL EN ARTERIA CARÓTIDA Y DEPÓSITO TISULAR DE HIERRO MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA: RELACIÓN CON LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL SÍNDROME METABÓLICO

Gerard Blasco Solà

Dipòsit legal: Gi. 1321-2015

<http://hdl.handle.net/10803/300591>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

Tesis Doctoral

Estudio de la Rigidez Arterial en Arteria Carótida y Depósito Tisular
de Hierro mediante Resonancia Magnética:
Relación con los Factores de Riesgo Asociados al Síndrome Metabólico

Gerard Blasco Solà



Universitat de Girona

Tesis Doctoral

Estudio de la Rigidez Arterial en Arteria Carótida y Depósito Tisular
de Hierro mediante Resonancia Magnética:
Relación con los Factores de Riesgo Asociados al Síndrome Metabólico

Gerard Blasco Solà

– 2014 –

Programa de doctorado en Biología Molecular, Biomedicina i Salud

Dirigida por:

Dr. Wifredo Ricart

Dr. Simone Balocco

Dr. José-Manuel Fernández-Real

– Memoria presentada para optar al título de doctor por la *Universitat de Girona* –

*“A la meva dona Kirste i a les meves filles Danna i Irina;
les tres dones de la meva vida que m’han donat el motiu de fer i ser”*

Agradecimientos

La presentación de esta tesis es un logro que únicamente puede ser explicado por los grandes profesionales y mejores personas con los que tengo el privilegio de tener a mi lado. No habría tiempo ni expresiones suficientes para transmitir mi gratitud hacia cada una de las personas que se presentan a continuación:

En primer lugar quiero agradecer y dedicar muy especialmente esta tesis a Dr. Javier Sánchez-González. Le agradezco su implicación en todos los proyectos que he llevado a cabo desde que nos conocemos; también le agradezco que haya sido mi maestro de resonancia magnética desde que nos conocemos; pero por encima de todo, le agradezco haber contado con su amistad en los momentos más difíciles desde que nos conocemos. Su saber ser y estar siempre serán una guía para mí.

Al Dr. Wifredo Ricart y Dr. José Manuel Fernández-Real de los que he tenido el privilegio de contar con su dirección sin la cual esta tesis nunca hubiera sido posible. Muy especialmente les agradezco haberme dado la oportunidad de formar (una pequeña) parte de su gran equipo.

Al Dr. Simone Balocco le agradezco su estilo de dirección y sobretodo su forma de ser; su exigencia, insistencia, tenacidad y persistencia combinado con su apoyo e implicación incondicional en los momentos más difíciles han hecho posible esta tesis.

Al Dr. Josep Puig, mi socio y amigo con el que he tenido la gran suerte de coincidir en este mundo. Los sueños que teníamos hace más de 10 años son hoy una realidad, y sin embargo la ilusión del primer día sigue intacta.

También quiero agradecer al Dr. Pepus Daunis su inestimable apoyo estadístico y muy especialmente sus clases “particulares” de las cuales me han permitido entender y disfrutar un poco más del complejo mundo de la estadística.

Al Dr. Salvador Pedraza por toda su trayectoria profesional, su visión de la investigación para el desarrollo de la radiología, y sobre todo por su apuesta y liderazgo desde el primer día del grupo de investigación en neuroimagen del cual tengo la suerte de formar parte.

Del mismo modo, quiero agradecer al Dr. Albert Barberà y al Institut d'Investigació Biomèdica de Girona por su apuesta e implicación en el grupo de neuroimagen y haberme brindado los medios y recursos necesarios para poder llevar a cabo esta tesis.

A todos mis compañeros del servicio de TC y RM del Institut de Diagnòstic per la Imatge del hospital Josep Trueta de Girona; en primer lugar por la infinita paciencia que tienen conmigo, pero en especial por su gran labor e implicación en el día a día, y que pese a las dificultades, siguen brindando una calidad asistencial de excelencia a todos los pacientes.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a las personas a las que más admiro en el mundo; mis padres. Por los valores en los que me han educado basados en el esfuerzo, el respeto a los demás y la humildad; por ser mi punto de apoyo inquebrantable y desinteresado, que a pesar de las distancias siempre está cerca.

Esta tesis ha sido parcialmente financiada mediante el proyecto europeo FLORINASH (FP7-HEALTH -2009-2.4.5-1)

Publicaciones Derivadas de la Tesis

Esta tesis doctoral se presenta en compendio de los siguientes artículos:

- Blasco G, Balocco, Josep Puig, Wifredo Ricart, Sánchez-González J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Pedraza S, Fernández-Real JM. **Carotid Pulse Wave Velocity by Magnetic Resonance Imaging is increased in Middle-aged Subjects with the Metabolic Syndrome.** *Int J Cardiovasc Imaging*. 2014 [Epub ahead of print]. ISSN, 1569-5794; Factor de Impacto, 2.64.
- Blasco G, Puig J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Xifra G, Fernández-Aranda F, Pedraza Salvador, Ricart W, Portero-Otín M, Fernández-Real JM. **Brain Iron Overload, Insulin Resistance and Cognitive Performance in Obese Subjects: a Preliminary MRI Case-Control Study.** *Diabetes Care* 2014;37(11):3076-83. ISSN, 1569-5794; Factor de Impacto, 8.57.

Tabla de Abreviaciones

SMet	Síndrome metabólico
RM	Resonancia magnética
ECV	Enfermedad cardiovascular
DM	Diabetes mellitus
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
RM	Resonancia Magnética
HTA	Hipertensión arterial
RI	Resistencia a la insulina
DHH	Depósito de hierro hepático
PS	Promoción de la salud
PP	Prevención primaria
RA	Rigidez arterial
LDL	Lipoproteína de baja densidad
VOP	Velocidad de la onda del pulso
DHC	Depósito de hierro cerebral

Índice de Figuras

1.	Complicaciones asociadas a la obesidad y al Síndrome Metabólico.....	12
2.	Interrelación entre los componentes del Síndrome Metabólico y sus complicaciones clínicas.....	22
3.	Estudio convencional de la velocidad de la onda del pulso en aorta mediante el método convencional.....	27
4.	Estudio de la esteatosis hepática mediante ecografía.....	31
5.	El fenómeno de la resonancia magnética.....	32
6.	Estudio de la velocidad de onda del pulso en arteria carótida común mediante resonancia magnética	34
7.	Estudio de la esteatosis hepática mediante resonancia magnética.....	35
8.	Estudio del depósito de hierro tisular mediante resonancia magnética.....	38

Tabla de Contenido

Agradecimientos.....	i
Publicaciones Derivadas de la Tesis	iii
Tabla de Abreviaciones.....	v
Índice de Figuras	vii
Resum.....	3
Resumen.....	5
Abstract	7
Introducción	9
1.1 Motivación	9
1.2 El Síndrome Metabólico.....	11
1.2.1 Factor de Riesgo Cardiovascular.....	13
1.2.2 Factor de Riesgo Metabólico.....	14
1.2.3 Factor de Riesgo de Neurocognitivo.....	15
1.3 Relevancia y limitaciones de la Clasificación del Riesgo Preclínico	16
1.4 Presentación de los Artículos	18
1.5 Estructura de la Tesis.....	20
Base Teórica e Investigación Previa.....	21
2.1 La Rigidez Arterial: Marcador de Riesgo Cardiovascular	23
2.1.1 La aterosclerosis.....	23
2.1.2 La Rigidez Arterial	24
2.1.3 Cuantificación de la Rigidez Arterial: Limitaciones de los Métodos Convencionales	26

2.2	Depósito de Hierro Tisular: Marcador de Riesgo Metabólico y Neurocognitivo.....	28
2.2.1	Depósito de Hierro Hepático y Esteatosis: Marcadores de Riesgo Metabólico ...	28
2.2.2	Depósito de Hierro Cerebral: Marcador de Riesgo Neurocognitivo.....	29
2.2.3	Cuantificación de la Esteatosis y Depósito de Hierro Tisular: Limitaciones de los Métodos Convencionales	30
2.3	Biomarcadores de Riesgo mediante Resonancia Magnética	32
2.3.1	Estudio de la Velocidad de la Onda del Pulso	33
2.3.2-1	Estudio de la Esteatosis Hepática.....	35
2.3.2-2	Estudio del depósito de hierro tisular	37
	Hipótesis y Objetivos	41
	Artículos Publicados.....	43
	Discusión.....	71
5.1	Rigidez Arterial en Arteria Carótida y su relación con el Síndrome Metabólico.....	72
5.2	Depósito de Hierro Tisular y su relación con el Síndrome Metabólico.....	73
5.3	El rol de la RM para la clasificación del riesgo cardiometabólico preclínico	75
	Conclusiones.....	79
	Bibliografía	81
	Artículos y comunicaciones científicas relacionadas con esta tesis.....	101
7.1	Otros artículos publicados	102
7.2	Artículos en revisión editorial	117
7.3	Contribuciones a Congresos.....	117

Resum

La Síndrome Metabòlica és una de las causes més importants del desenvolupament de malaltia cardiovascular, diabetis, fetge gras no alcohòlic o trastorns neurodegeneratius. No obstant, encara es desconeixen molts dels mecanismes subjacents mitjançant els quals aquest síndrome contribueix a l'increment del risc cardiometabòlic o neurocognitiu. La ressonància magnètica és una modalitat de diagnòstic per la imatge que es caracteritza per la seva gran capacitat per determinar i quantificar diferents propietats d'un mateix teixit aconseguint detectar canvis precoços que serien imperceptibles en altres modalitats. L'objectiu general d'aquesta tesi consisteix en posar de manifest la utilitat d'alguns biomarcadors avançats de ressonància magnètica per a la identificació de canvis preclínics associats a la síndrome metabòlica que contribueixen a l'increment del risc cardiometabòlic o neurocognitiu en individus sense antecedents de diabetis o malaltia vascular isquèmica.

En primer lloc es va avaluar l'efecte de la síndrome metabòlica i els seus components sobre la rigidesa arterial mitjançant l'anàlisi de la velocitat de l'ona del pols en artèria caròtida comú per ressonància magnètica. Es van reclutar 35 individus amb síndrome metabòlica i 35 controls agrupats segons la seva edat (superior o inferior a 55 anys). Per l'anàlisi estadístic es van utilitzar els valors residuals de la correlació entre la edat i la rigidesa arterial. Els resultats van mostrar un augment de la rigidesa en artèria caròtida associada a la síndrome metabòlica en individus de mitjana edat ($p = 0.001$); però no en la població major de 55 anys ($p = 0.313$). La presència de la síndrome metabòlica es va associar a l'increment de la rigidesa arterial de manera independent a l'edat, sexe o pressió arterial ($p = 0.007$). La presència d'hipertensió ($p = 0.018$) i hipertrigliceridèmia ($p = 0.002$) van ser identificats com els components de la síndrome metabòlica que més contribueixen a l'increment de la rigidesa de l'artèria caròtida comú.

En segon lloc es van utilitzar biomarcadors de ressonància magnètica per identificar els components de la síndrome metabòlica que contribueixen a l'increment del dipòsit de ferro hepàtic i cerebral. A més, es va avaluar l'impacte neurocognitiu associat a la sobrecàrrega ferro.

En l'estudi van ser inclosos 23 individus amb obesitat (índex de massa corporal $>30\text{kg/m}^2$) i 20 controls sans en què es va analitzar la resistència a la insulina, l'esteatosi hepàtica i el rendiment cognitiu. Els resultats van mostrar un augment significatiu del dipòsit de ferro hepàtic ($p < 0.001$) i cerebral al nucli caudat ($p < 0.001$), lenticular ($p = 0.004$), hipotàlem ($p = 0.002$) i hipocamp ($p < 0.001$) en individus amb obesitat. Es va observar una relació entre l'increment del dipòsit de ferro hepàtic i el dipòsit de ferro al nucli caudat ($p < 0.001$), hipotàlem ($p = 0.009$) i hipocamp ($p < 0.023$). Els principals factors que es van identificar com a precursors de dipòsit de ferro van ser la resistència a la insulina i l'obesitat. Finalment, la sobrecàrrega de ferro cerebral associada a l'obesitat es correlacionava amb un empitjorament del rendiment cognitiu en les funcions executives.

En conclusió, aquesta tesi posa de manifest la potencial utilitat dels biomarcadors de ressonància magnètica per avaluar i monitoritzar el risc preclínic associat al a la síndrome metabòlica en individus sense antecedents de diabetis o malaltia vascular isquèmica.

Resumen

El Síndrome Metabólico constituye una de las causas más importantes del desarrollo de enfermedad cardiovascular, diabetes, hígado graso no alcohólico o trastornos neurodegenerativos. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos subyacentes mediante los cual este síndrome contribuye al incremento del riesgo cardiometabólico o neurocognitivo. La resonancia magnética es una modalidad de diagnóstico por la imagen que se caracteriza por su gran capacidad para determinar y cuantificar distintas propiedades de un mismo tejido logrando detectar cambios precoces que serían imperceptibles en otras modalidades. El objetivo general de esta tesis consiste en poner de manifiesto la utilidad de algunos biomarcadores avanzados de resonancia magnética para la identificación de cambios preclínicos asociados al síndrome metabólico que contribuyen al incremento del riesgo cardiometabólico o neurocognitivo en sujetos sin antecedentes de diabetes o enfermedad vascular isquémica.

En primer lugar se evaluó el efecto del síndrome metabólico y sus componentes sobre la rigidez arterial mediante el análisis de la velocidad de la onda del pulso en arteria carótida común por resonancia magnética. Se reclutaron 35 sujetos con síndrome metabólico y 35 controles agrupados según su edad (superior o inferior a 55 años). Para el análisis estadístico se utilizaron los valores residuales de la correlación entre la edad y la rigidez arterial. Los resultados mostraron un aumento de la rigidez en arteria carótida asociado al síndrome metabólico en sujetos de mediana edad ($p=0.001$); pero no en la población mayor de 55 años ($p=0.313$). Asimismo, la presencia del síndrome metabólico se asoció al incremento de la rigidez arterial de manera independiente a la edad, sexo o presión arterial ($p=0.007$). La presencia de hipertensión ($p=0.018$) e hipertrigliceridemia ($p=0.002$) fueron identificados como los componentes del síndrome metabólico que más contribuyen al incremento de la rigidez en arteria carótida común.

En segundo lugar se utilizaron biomarcadores de resonancia magnética para identificar los componentes del síndrome metabólico que contribuyen al incremento del depósito de hierro hepático y cerebral. Además, se evaluó el impacto neurocognitivo asociado a la sobrecarga hierro.

En el estudio fueron incluidos 23 sujetos con obesidad y 20 controles sanos en los que también se analizaron la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática y el rendimiento cognitivo. Los resultados mostraron un aumento significativo del depósito de hierro hepático ($p < 0.001$) y cerebral en núcleo caudado ($p < 0.001$), lenticular ($p = 0.004$), hipotálamo ($p = 0.002$) e hipocampo ($p < 0.001$) en sujetos con obesidad. Se observó una relación entre el incremento del depósito de hierro hepático y el depósito de hierro cerebral en núcleo caudado ($p < 0.001$), hipotálamo ($p = 0.009$) e hipocampo ($p < 0.023$). Los principales factores identificados como precursores de depósito de hierro fueron la resistencia a la insulina y la obesidad. Finalmente, la sobrecarga de hierro cerebral asociada a la obesidad se correlacionaba con el empeoramiento del rendimiento cognitivo en las funciones ejecutivas.

En conclusión, esta tesis pone de manifiesto la potencial utilidad de algunos biomarcadores de resonancia magnética para evaluar y monitorizar el riesgo preclínico asociado al síndrome metabólico en sujetos sin antecedentes de diabetes o enfermedad vascular isquémica.

Abstract

Metabolic Syndrome is one of the most important causes for the development of cardiovascular disease, diabetes, nonalcoholic fatty liver disease or neurodegenerative disorders. However, the underlying mechanisms by which metabolic syndrome contributes to increase cardiometabolic and neurocognitive risk are still unknown. Magnetic resonance is an imaging modality characterized by its ability to identify and quantify different tissue properties and detect early changes that would be imperceptible in other modalities. The aim of this work is to demonstrate the utility of some advanced biomarkers by magnetic resonance for identifying preclinical changes associated with metabolic syndrome that contribute to increased cardiometabolic and neurocognitive risk in subjects without diabetes or ischemic disease.

Firstly, the effect of metabolic syndrome and its components on arterial stiffness was evaluated by analyzing the pulse wave velocity in the common carotid artery using MRI. Thirty-five subjects with metabolic syndrome and 35 control subjects grouped by age (above or below 55 years) were recruited. In order to eliminate the effect of age on arterial stiffness the statistical analysis was performed by using the residuals of their correlation. Carotid stiffness was higher in middle-aged subjects with metabolic syndrome than in those without ($p=0.001$); but no differences were found in elder subjects ($p=0.313$). The metabolic syndrome was associated with increased carotid stiffness regardless of age, sex, blood pressure and waist ($p=0.007$). The components contributing independently to an increased pulse wave velocity were hypertension ($p=0.018$) and hypertriglyceridemia ($p=0.002$).

Secondly, magnetic resonance biomarkers are used to identify the components that contribute to increased hepatic iron concentration and brain iron overload. In addition, the impact of brain iron on cognitive performance was evaluated. The study included 23 obese subjects and 20 healthy controls that insulin resistance, hepatic steatosis and cognitive performance were assessed. Increased iron concentration was significantly detected at the caudate nucleus ($p<0.001$), lenticular nucleus ($p=0.004$), hypothalamus ($p=0.002$), hippocampus ($p<0.001$), and liver ($p<0.001$) in obese subjects. There was a positive correlation between liver and brain iron at the caudate ($r=0.517$, $p<0.001$), hypothalamus ($r=0.396$, $p=0.009$), and hippocampus ($r=0.347$, $p<0.023$).

Obesity and insulin resistance were found the main factors that contribute to tissue iron deposition. Finally, obesity-associated brain iron overload was correlated with worse cognitive performance on executive functions.

In conclusion, this thesis demonstrates the potential utility of magnetic resonance to evaluate the preclinical risk associated with metabolic syndrome in subjects without diabetes or ischemic disease.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Motivación

La obesidad es considerada una enfermedad metabólica que contribuye al incremento del riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV), diabetes mellitus (DM), insuficiencia renal, problemas articulares, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), trastornos neurodegenerativos, y cáncer (1–3). El estilo de vida sedentario junto a una dieta hipercalórica provoca una serie de cambios metabólicos que desencadenan o facilitan el desarrollo de múltiples factores patogénicos. De este modo, la obesidad se suele acompañar de alteraciones relacionadas con el aumento de la resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, bajas concentraciones de colesterol HDL e hipertensión. La concomitancia de estos factores de riesgo se conoce con el nombre de Síndrome Metabólico (SMet).

No obstante, además del SMet, la obesidad también está asociada a la presencia apneas del sueño, importantes alteraciones en el metabolismo del hierro, así como a la inducción de un estado proinflamatorio y protrombótico crónico(4).

La prevalencia de la obesidad y el SMet en el mundo aún va en aumento y en edades cada vez más tempranas. Informes realizados por la *World Obesity Federation* estiman que actualmente en el mundo hay cerca de un billón de adultos con sobrepeso y más 475 millones con obesidad. Estos mismos informes revelan que en la población infantil la obesidad y el sobrepeso afectan a más de 200 millones de niños (5). Dada su alta mortalidad y comorbilidad asociada junto a su gran prevalencia, actualmente la obesidad constituye uno de los problemas de salud más importantes y con mayor impacto socio-económico a la que se enfrentan las sociedades del siglo XXI.

A pesar de los avances significativos en el manejo diagnóstico y del gran conocimiento epidemiológico, genético y molecular desarrollado en las últimas décadas, aún no se conoce con exactitud todos los mecanismos patogénicos subyacentes al SMet. Tampoco existen unos criterios diagnósticos claramente establecidos que permitan identificar y monitorizar todas sus potenciales manifestaciones y complicaciones clínicas asociadas. No obstante, se ha observado que la normalización del peso mediante el ejercicio físico y hábitos saludables permite la recuperación positiva del estado cardiometabólico (6). Dado este potencial carácter de reversibilidad, se ha subrayado la necesidad de incorporar nuevos biomarcadores mediante técnicas no invasivas que permitan establecer algoritmos más precisos de clasificación y monitorización del riesgo cardiometabólico. Especialmente en aquellas fases preclínicas y asintomáticas, donde la intervención preventiva y terapéutica resulta más eficaz.

Desde que en diciembre del 1983 el profesor Jaume Gili introdujo la resonancia magnética (RM) en nuestro país hasta la fecha, esta modalidad de imagen se ha convertido en una pieza clave en el avance y desarrollo de multitud de especialidades médicas y científicas (7). Actualmente la RM constituye una de las principales herramientas utilizadas en el diagnóstico y manejo clínico en oncología, neurología, traumatología, cardiología o psiquiatría entre otras disciplinas. La RM es una modalidad de imagen no ionizante, no invasiva, precisa y reproducible caracterizada por su gran capacidad para obtener información morfológica, fisiológica, metabólica y funcional de los tejido.

Esta gran capacidad multiparamétrica ha sido aprovechada ampliamente y principalmente en el estudio de entidades patológicas de manifestación clínica. Sin embargo, aún existe escasa evidencia del potencial rol que puede tener la RM para la identificación y monitorización de cambios estructurales y metabólicos preclínicos asociados al SMet y sus factores de riesgo.

Así pues, el punto de partida y motivo de la presente tesis consiste en explorar una nueva línea de investigación y conocimiento basada en el estudio y desarrollo de biomarcadores preclínicos de RM que permitan mejorar el manejo clínico-terapéutico del SMet y sus componentes.

1.2 El Síndrome Metabólico

El SMet es una alteración metabólica que se define por la presencia de distintos factores de riesgo interrelacionados que incrementan de manera directa la morbilidad por ECV, DM tipo 2 y trastornos neurodegenerativos (Figura 1) (3). Sus principales componentes vienen determinados por la presencia de obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial (HTA) y resistencia a la insulina (RI). Aunque la prevalencia del SMet pueda variar según el criterio diagnóstico utilizado y de otros factores como la edad, el sexo, la raza o la etnia, se estima que en adultos está alrededor del 15% y el 30% en Europa y Estados Unidos respectivamente (8,9). Además, su prevalencia va en aumento y en edades cada vez menores, probablemente debido a la obesidad endémica y estilos de vida en las sociedades occidentales.

Inicialmente este trastorno fue descrito en 1988 por Reaven con el nombre de síndrome X, que posteriormente se renombró como SMet, considerando la RI como su componente principal (10). La Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación basada en la RI con la presencia de dos y o más factores de riesgo relacionados con la HTA, dislipidemia, obesidad o microalbuminúria (11).

Poco después, la *European Group for the study of Insulin Resistance* eliminó la microalbuminuria como componente del SMet y excluyó el índice de masa corporal (IMC) como medida de obesidad introduciendo nuevos puntos de corte a los anteriormente descritos (12).

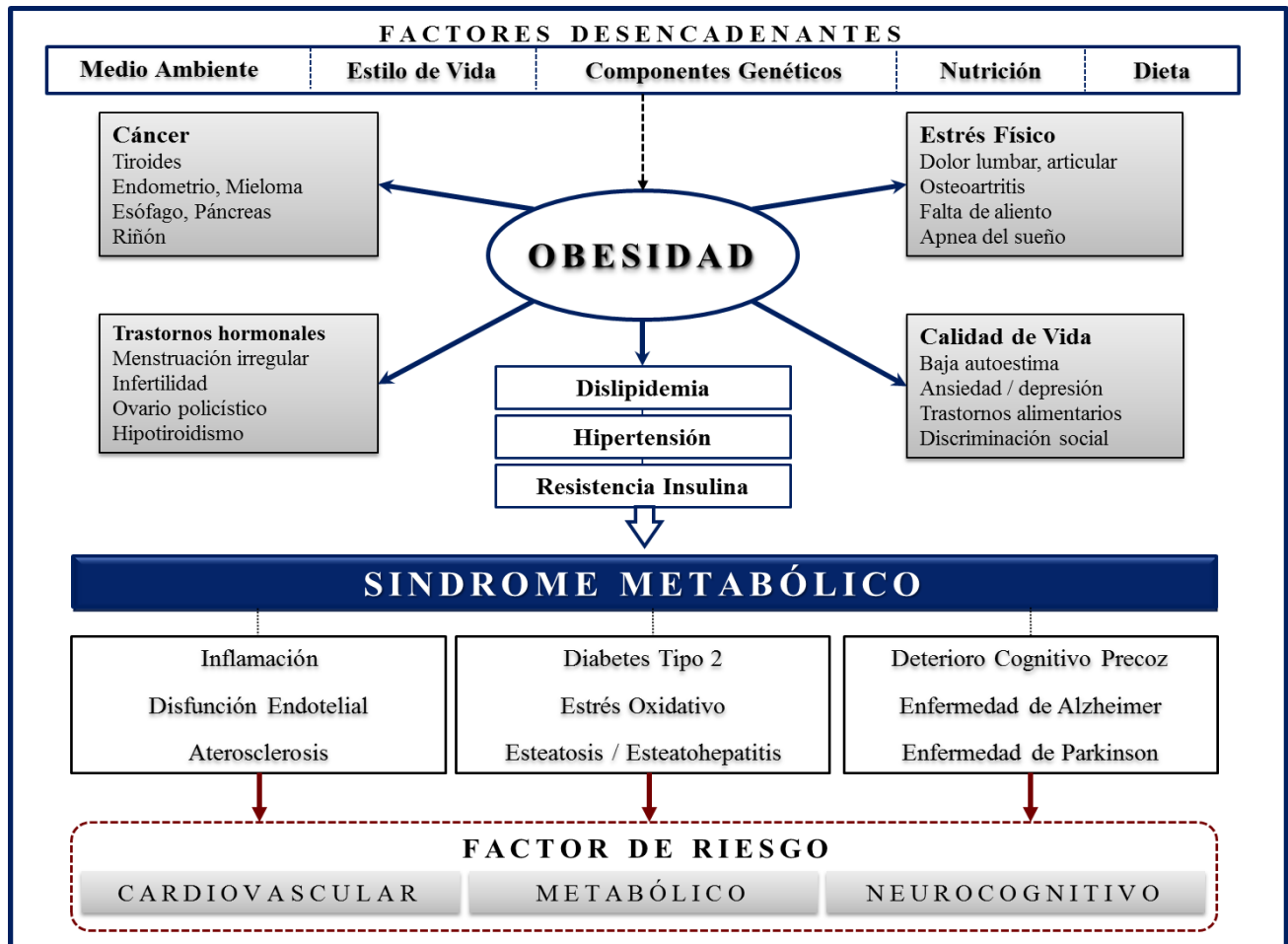


Figura 1. Complicaciones asociadas a la obesidad y al Síndrome Metabólico. La dieta y el estilo de vida son los principales desencadenantes de la obesidad. La presencia prolongada de la obesidad puede inducir a múltiples complicaciones en las que destaca la dislipidemia, la resistencia a la insulina y la hipertensión. Juntos conforman el llamado Síndrome Metabólico que está asociado a alteraciones metabólicas relacionadas con el incremento del riesgo cardiovascular, metabólico y neurocognitivo.

En 2001, el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, redefinió el SMet diferenciándose de las anteriores en que la RI no es elemento imprescindible para el diagnóstico del SMet (13). Más tarde, la *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute* (AHA/NHLBI) modificó el punto de corte de la alteración de la glucosa en ayunas (14).

La *International Diabetes Federation* publicó nuevos criterios donde la obesidad pasaba a ser un requisito obligatorio de SMet y se establecían distintos puntos de corte según la población estudiada (4). Finalmente en 2009 se estableció una definición de consenso a partir de los criterios propuestos por la AHA/NHLBI y estableciendo distintos puntos de cortes en la medida de la obesidad según la población (15).

Además de los factores aceptados que actualmente constituyen el SMet, también se ha propuesto incluir otras manifestaciones como el estado proinflamatorio y protrombótico crónico(4), la presencia de EGHNA (16) o la apnea del sueño (17).

1.2.1 Factor de Riesgo Cardiovascular

La presencia del SMet se asocia a una mayor carga aterosclerótica subclínica (18,19), y provoca mayor mortalidad y morbilidad por ECV independiente a la edad, el sexo y la raza (8,20–24). Además, dados los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de sus componentes como la RI y la obesidad, a menudo precede al desarrollo de la DM tipo 2 o a la EGNHA. Procesos que dañan aún más el sistema cardiovascular. A pesar del gran conocimiento epidemiológico desarrollado a partir del estudio Framingham a principios de los años 50 (25) y los grandes avances en la clasificación del riesgo cardiovascular, el SMet y sus componentes siguen siendo los principales factores desencadenantes de morbimortalidad por ECV.

Debido a su capacidad predictiva para la ECV, el diagnóstico del SMet ha sido propuesto para la clasificación y monitorización del riesgo cardiovascular en poblaciones susceptibles de ECV. Sin embargo, actualmente existe un amplio debate y controversia acerca de si esta entidad representa un síndrome específico por sí mismo, o si su riesgo asociado supera la suma de sus componentes individuales. Incluso se ha cuestionado su valor real para determinar el riesgo cardiovascular.

1.2.2 Factor de Riesgo Metabólico

La presencia del SMet también se asocia a distintos factores de riesgo metabólicos relacionados con alteraciones en el depósito de hierro y lípidos. Alteraciones metabólicas que tienen como principal órgano regulador y de manifestación el hígado. Por lo tanto, el SMet constituye uno de los principales problemas de salud que no sólo contribuye al incremento del riesgo cardiovascular sino que también contribuye al desarrollo de factores de riesgo metabólicos precursores de la EHGNA y la RI.

La EHGNA se define por una serie de condicionantes clínicos que provocan una esteatosis macrovesicular del hígado. La obesidad induce a la incapacidad del tejido adiposo para almacenar y metabolizar toda la grasa. Esto provoca el aumento del tejido adiposo visceral junto el desborde de lípidos que acaban acumulándose de forma ectópica fuera del tejido adiposo; especialmente en el hígado. La prevalencia de la EHGNA en las sociedades desarrolladas está entre el 15 y el 30% de la población adulta, aunque en sujetos con obesidad o DM puede llegar hasta el 70%. La EGNHA se ha relacionado con el desarrollo y aceleración de la arteriosclerosis subclínica, con mayor morbimortalidad por ECV, y con un peor pronóstico tras un infarto de miocardio (26–30) . Además, la EHGNA es el principal agente causante de la patología crónica del hígado evolucionando a cirrosis y a carcinoma hepatocelular (Figura 2). El espectro de esta enfermedad incluye un rango de entidades clínicas que van desde la simple esteatosis hasta la esteatohepatitis no alcohólica (26).

El SMet es también un predictor independiente del incremento del estrés oxidativo sistémico, factor que contribuye en la patogénesis de la RI y la ECV (31). El hierro es un elemento fundamental en el proceso oxidativo como regulador del acúmulo de lípidos y oxidación. Estudios recientes ponen de manifiesto el potencial rol del hierro y su acúmulo como precursores de la RI, la EHGNA y también de algunos trastornos neurodegenerativos (32–35). Esto es relevante porque se ha identificado un estado clínico-patológico primario caracterizado por el incremento del depósito de hierro hepático (DHH) con saturación de transferrina normal en presencia del SMet (36,37).

El exceso de DHH interactúa con los radicales del oxígeno de modo que su acúmulo induce a la fibrosis y a una mayor RI. En consonancia, también ha sido observado un incremento del DHH en pacientes con EGHNA o homeostasis de la glucosa alterada (38,39). Sin embargo, no existe aún una evidencia clara de la relación entre el DHH y los mecanismos desencadenantes de RI y EHGNA.

1.2.3 Factor de Riesgo de Neurocognitivo

Existe creciente evidencia de la estrecha relación que existe entre la homeostasis metabólica, la estructura cerebral y la capacidad cognitiva en pacientes con SMet (40–43). De hecho, estudios de casos y controles han demostrado que la obesidad y la RI están asociadas a un peor rendimiento cognitivo en funciones ejecutivas, de memoria, atención o velocidad de procesamiento (44–46). Además, la obesidad y la RI se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar demencia y determinados trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (46–49).

Existe una relación bidireccional entre los componentes del SMet y el cerebro. Una dieta rica en grasas induce cambios inflamatorios en el hipotálamo que contribuye a la resistencia de la leptina, el incremento de peso y a una alteración central de la sensibilidad a la glucosa (50–52). La insulina contribuye a la sinaptogénesis y a la remodelación sináptica. Además, regula el metabolismo de la glucosa cortical y la expresión de ciertos neurotransmisores como la acetilcolina y la norepinefrina que tienen implicaciones en el rendimiento cognitivo (41). En presencia del SMet se han descrito algunos cambios cerebrales en asociación a los componentes del SMet. En concreto se han observado alteraciones estructurales y funcionales manifestados por una disminución del volumen de sustancia blanca, la reducción del volumen sanguíneo en córtex cerebral, alteraciones de la sustancia blanca, pérdida de conectividad cerebral o aumento de la gliosis hipotalámica (40,53–55). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos subyacentes mediante los cual la el SMet, y en particular la obesidad y la RI, contribuyen al empeoramiento cognitivo o a la demencia. De hecho, los parámetros convencionales de obesidad, tolerancia a la glucosa o de RI no explican el desarrollo de alteraciones cognitivas ni neurodegenerativas (56,57).

La mejor comprensión de los mecanismos subyacentes mediante los cual el SMet y sus componentes contribuyen al daño cerebral y cognitivo puede permitir el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas más eficaces que permitan reducir o atrasar sus manifestaciones clínicas.

1.3 Relevancia y limitaciones de la Clasificación del Riesgo Preclínico

La promoción de la salud (PS) y prevención primaria (PP) están aceptadas como las estrategias más eficaces para reducir la morbimortalidad y retrasar la aparición aguda de cualquiera de las manifestaciones clínicas relacionadas con el SMet. En términos generales parten del conocimiento que la obesidad y el SMet se desarrollan durante décadas, caracterizándose por una larga fase asintomática en que es posible modificar el curso de la enfermedad mediante actuaciones específicas. La PS y PP tienen la capacidad de introducir estilos de vida saludables en la sociedad y determinar las estrategias preventivas más eficaces. Además, el control y el manejo de los factores de riesgo que componen el SMet como la HTA, la dislipidemia, la obesidad y la DM son algunos de los principales campos de actuación e intervención de la PP y PS.

En la actualidad, la intensidad de las intervenciones de PP y PS se determina a partir de la clasificación del riesgo cardiovascular o metabólico. Esta clasificación del riesgo se realiza mediante la utilización de distintos de modelos predictivos basados en marcadores de riesgo. Por ejemplo, existen distintos modelos predictivos para la clasificación del riesgo cardiovascular como Framingham (*Framingham Risk Score*) (58) utilizada principalmente en los Estados Unidos, la evaluación del riesgo coronario sistémico (SCORE) (59) utilizada principalmente en Europa, y también la clasificación ReGiCor (*Registre Gironí del Cor*) (60) utilizada en la provincia de Girona. Sin embargo, las estrategias de PP y PS pueden ser inadecuadas o ineficaces sin una correcta clasificación del riesgo cardiometabólico.

Debido el carácter progresivo y subclínico del SMet y a la compleja interacción de sus muchos componentes, los actuales modelos de clasificación de riesgo presentan importantes limitaciones. En primer lugar, los algoritmos predictivos se basan en factores de riesgo muy prevalentes, lo que produce que sean menos discriminativos en la predicción. Además, estos modelos predictivos ignoran marcadores de riesgo relevantes relacionados con la RI, obesidad, estado vascular, antecedentes familiares, sedentarismo o estilos de vida. Finalmente, muchos de los cambios y alteraciones producidos por el SMet se dan de manera progresiva y asintomática y en población considerada de bajo riesgo. Incluso un estado avanzado de afectación cardiometabólica puede estar presente en ausencia de sintomatología clínica. Estas limitaciones han puesto de manifiesto la necesidad de incorporar nuevos biomarcadores mediante técnicas no invasivas que permitan clasificar y monitorizar de manera más precoz y precisa el riesgo cardiometabólico asociado al SMet.

La RM es una modalidad de imagen no invasiva y no ionizante caracterizada por su gran capacidad para el estudio multiparamétrico de los tejidos. La RM permite detectar alteraciones y cambios tisulares muy precoces que serían imperceptibles en otras modalidades de imagen. Esta gran habilidad está dando lugar al desarrollo de un nuevo concepto de imagen de RM basado en el estudio de biomarcadores de daño tisular precoz y asintomático. Lo que algunos han denominado como imagen preclínica mediante RM. Así pues, son necesarios estudios que incorporen biomarcadores avanzados de RM que permitan identificar y monitorizar cambios estructurales y metabólicos preclínicos asociados al SMet y sus componentes. Estos nuevos biomarcadores de RM tienen el importante y difícil reto de proporcionar un nuevo conocimiento que permita mejorar los algoritmos actuales de clasificación e intervención del riesgo cardiovascular y metabólico.

1.4 Presentación de los Artículos

La presente tesis se basa en el análisis de biomarcadores avanzados de RM que pueden ser de utilidad para la identificación y monitorización de las alteraciones preclínicas de riesgo asociadas al SMet y sus componentes. En particular, esta tesis pone de manifiesto el potencial valor de la RM para determinar el efecto de los componentes del SMet sobre la elasticidad arterial en arteria carótida y el depósito hierro hepático y cerebral en sujetos sin antecedentes de DM o ECV.

El primer artículo que conforma esta tesis se titula **“Carotid Pulse Wave Velocity by Magnetic Resonance Imaging is increased in Middle-aged Subjects with the Metabolic Syndrome”** y ha sido publicado en *International Journal of Cardiovascular Imaging* en 2014 (ISSN, 1569-5794; Factor de Impacto, 2.64). En este artículo se utiliza la RM para cuantificar la velocidad de la onda del pulso en arteria carótida común como índice de elasticidad vascular y se analiza el efecto que tiene el SMet y sus componentes sobre la rigidez arterial.

El segundo artículo de esta tesis se titula **“Brain Iron Overload, Insulin Resistance and Cognitive Performance in Obese Subjects: a Preliminary MRI Case-Control Study”** y ha sido publicado en la revista *Diabetes Care* en noviembre de 2014 (ISSN, 1569-5794; factor de Impacto, 8.57). En este trabajo se realiza un abordaje multiorgánico de RM para la cuantificación del depósito de hierro hepático y cerebral en sujetos con obesidad. Además, se identifican los factores determinantes de su acúmulo y se evalúa el impacto cognitivo asociado a la sobrecarga de hierro cerebral.

Los trabajos que conforman esta tesis establecen importantes e innovadoras aportaciones al conocimiento de cómo el SMet contribuye al riesgo cardiovascular, metabólico y neurocognitivo. En concreto:

- Por primera vez se utiliza la RM para determinar la velocidad de la onda del pulso en arteria carótida común en sujetos con riesgo cardiovascular y se pone de manifiesto su potencial utilidad para determinar el daño vascular precoz asociado al SMet.

- Se demuestra que el SMet contribuye al aumento prematuro de la rigidez arterial en arteria carótida de manera independiente de la edad y la tensión arterial.
- Se identifica la presencia de HTA e hipertrigliceridemia como los factores de riesgo del SMet que más contribuyen al aumento de la rigidez arterial en arteria carótida.
- Se describe por primera vez la relación en paralelo que existe entre el aumento en del depósito de hierro hepático y cerebral en presencia de obesidad.
- Se identifica la obesidad, la sensibilidad a la insulina y la grasa intrahepática como los principales desencadenantes de depósito de hierro hepático, confirmando así, la estrecha interrelación que existe entre ellos.
- Se identifica un incremento del depósito de hierro en hipotálamo, hipocampo, núcleo lenticular y caudado asociado a la presencia de obesidad y se establecen los puntos de corte que permiten determinar la presencia de sobrecarga de hierro asociada a la obesidad.
- Se identifica la obesidad y la resistencia a la insulina como predictores independientes del depósito de hierro cerebral.
- Se demuestra el rol de la sobrecarga de hierro cerebral como potencial precursor del empeoramiento en el rendimiento cognitivo en sujetos con obesidad.

1.5 Estructura de la Tesis

La presente tesis está estructurada del siguiente modo. Tras la sección introductoria del capítulo 1, se describen en el Capítulo 2 las bases teóricas e investigaciones previas en la que se basan las hipótesis planteadas en esta tesis. En el Capítulo 3 se presentan las distintas hipótesis de trabajo y los objetivos de estudio. El Capítulo 4 constituye el núcleo central de la tesis y contiene la transcripción de los artículos publicados. El Capítulo 5 incluye una breve discusión de los resultados más relevantes y se debate el potencial rol de la RM en el manejo del riesgo preclínico asociado al SMet. Finalmente en el Capítulo 6 se presentan las principales conclusiones y las futuras líneas de trabajo. Finalmente se incluye un último capítulo de anexo con otras publicaciones y actividades científicas realizadas dentro del marco de esta tesis.

Capítulo 2

Base Teórica e Investigación Previa

El SMet resulta de la compleja interacción sinérgica y sistémica de múltiples factores de riesgo que producen alteraciones funcionales o estructurales que inducen al daño tisular. El árbol arterial, el hígado, el cerebro y el tejido adiposo son los principales órganos afectados por la presencia de los factores de riesgo del SMet. Del mismo modo, el deterioro progresivo de estos tejidos da lugar a las manifestaciones clínicas más importantes del SMet relacionadas con la ECV, la DM tipo 2 y trastornos neurocognitivos (Figura 2). Dado el carácter evolutivo y progresivo del SMet resulta fundamental identificar potenciales biomarcadores de riesgo preclínico que permitan identificar de manera precoz un incremento del riesgo cardiovascular, metabólico o neurocognitivo. No obstante, los biomarcadores de RM deben ser capaces además, de poder ofrecer información adicional y relevante que no pueda ser obtenida mediante los métodos convencionales.

A continuación se describe la base teórica y estado del arte de los biomarcadores de riesgo cardiovascular y metabólico utilizados en esta tesis. Además, se detallan las principales limitaciones de los métodos convencionales de medida, y finalmente se presentan los fundamentos técnicos de los biomarcadores de RM utilizados en esta tesis.

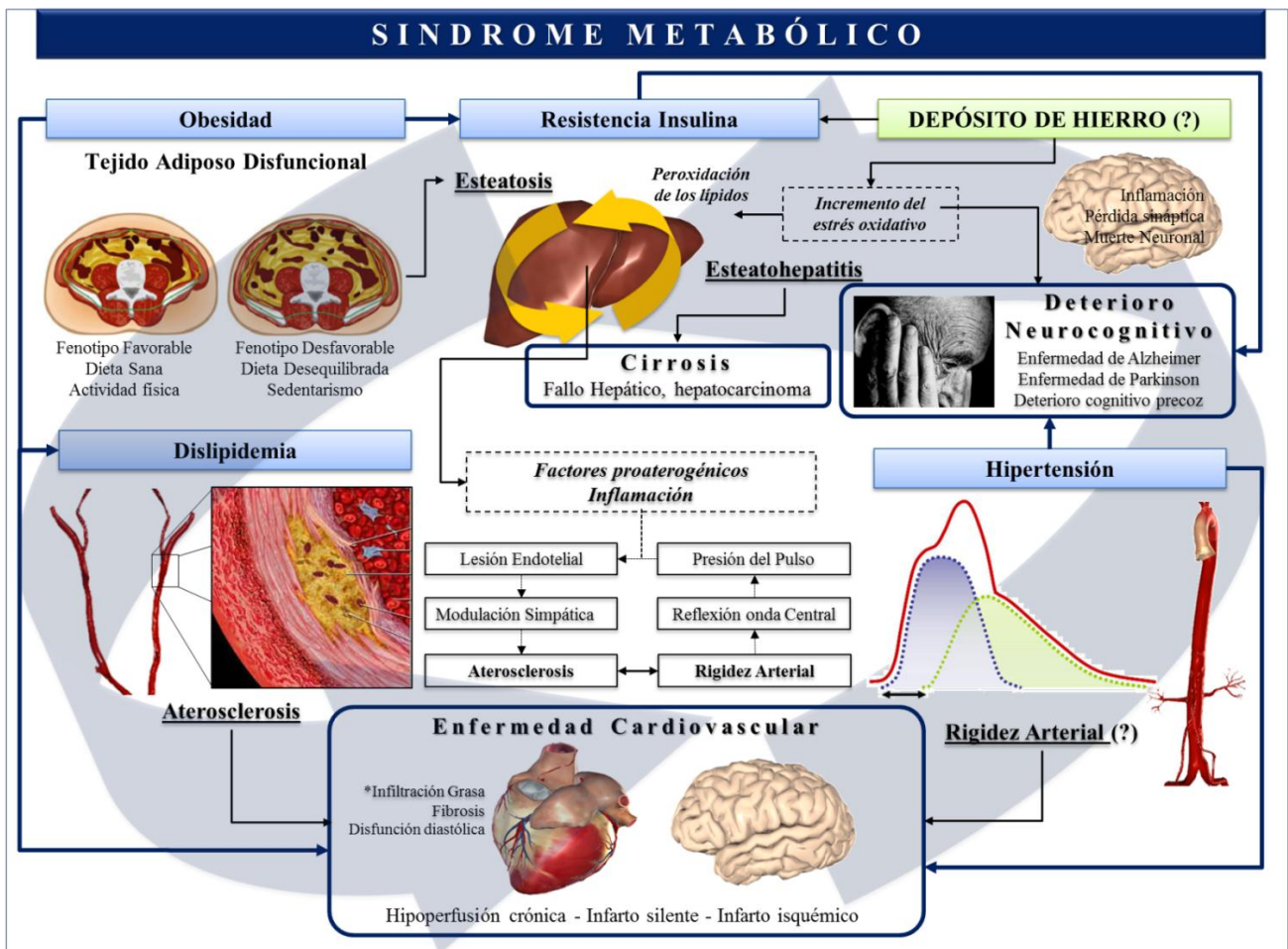


Figura 2. Interrelación entre los componentes del Síndrome Metabólico y sus complicaciones clínicas. Las complicaciones clínicas del Síndrome Metabólico vienen determinadas por la compleja interacción y sinergia entre los distintos factores de riesgo. Tejido adiposo disfuncional desencadena esteatosis hepática que puede evolucionar a esteatohepatitis y cirrosis por interacción de la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo. A su vez, la obesidad induce a un estado de dislipidemia e hipertensión que favorece el desarrollo de enfermedad cardiovascular isquémica mediante la relación sinérgica del aumento de la rigidez arterial y la aterosclerosis. Finalmente, factores de riesgo como la obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión o estrés oxidativo se asocian al deterioro cognitivo. Esta tesis analiza el rol del depósito de hierro tisular y de la rigidez arterial mediante resonancia magnética como biomarcadores de riesgo precoz en relación a los componentes del Síndrome Metabólico.

2.1 La Rigidez Arterial: Marcador de Riesgo Cardiovascular

La arteriosclerosis es una enfermedad sistémica y difusa que afecta principalmente a las paredes arteriales del cerebro, corazón y extremidades inferiores. Sus manifestaciones clínicas son la principal causa de mortalidad y discapacidad en los países desarrollados. Existen distintos mecanismos fisiopatológicos subyacentes que dañan la integridad de la pared vascular y que dan lugar a la arteriosclerosis. Los principales son el depósito lipídico que da lugar a la aterosclerosis, y otro ocasionado por el aumento de la rigidez arterial (RA).

2.1.1 La aterosclerosis

En general, la aterosclerosis empieza por una lesión del endotelio, normalmente producida por fuerzas de fricción locales y que es intensificada por algunos de los factores de riesgo asociados al SMet como un nivel de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) elevado, la HTA, la DM, además del consumo de tabaco o infección. En la pared íntima del endotelio lesionado aparece una acumulación de LDL. Esto provoca una respuesta autoinmune que genera una formación de células espumosas cargadas de lípidos que posteriormente se depositan conjuntamente con el colesterol, formando así la placa de ateroma. Paralelamente, se crea una capa fibrosa que envuelve el *core* lipídico. La ruptura de esta capa y la consecuente extravasación de su contenido al torrente sanguíneo van a provocar el accidente vascular isquémico (61).

El grosor del complejo íntima-media en arteria carótida común, medido mediante ecografía, es un marcador establecido del proceso de aterosclerosis. Su mayor potencial radica en que es un método no invasivo, tecnológicamente muy asequible y poco costoso, que se correlaciona con los factores de riesgo vascular clásicos y además tiene valor predictivo independiente para los accidentes vasculares isquémicos (62–64). Por este motivo, este marcador vascular ha sido muy utilizado para la cuantificación de la arteriosclerosis y habitualmente se ha propuesto como herramienta de cribado para identificar pacientes de alto riesgo cardiovascular (65–67).

Sin embargo, existe cierta evidencia que indica que incorporar el grosor íntima-media como biomarcador vascular no mejora el valor predictivo de las clasificaciones del riesgo tradicionales (68–72). Además, tampoco es recomendado para valorar la eficacia de las intervenciones de PP y PS ni algunos tratamientos farmacológicos debido a que el progreso de la aterosclerosis puede ser muy variable entre sujetos (72). Todo ello ha hecho que el potencial valor del grosor de la íntima-media en arteria carótida para la estratificación del riesgo en la población asintomática haya quedado entredicho.

2.1.2 La Rigidez Arterial

La elasticidad arterial de los grandes vasos proximales es el resultado del alto ratio de elastina-colágeno que existe en sus paredes y que progresivamente se reduce en los vasos periféricos. La elasticidad en un segmento arterial no es constante y depende de su capacidad de distensión y de la presión arterial. El aumento de la RA ocurre con la edad y es intensificada por factores de riesgo que provocan una progresiva degeneración de las fibras elásticas. El incremento de la RA provoca cambios estructurales en el medio vascular como la rotura de elastina y el depósito de colágeno y calcio. También se ha asociado a cambios en el tono muscular, causados en parte por factores endoteliales como el óxido nítrico.

La RA resulta del aumento de la presión del pulso arterial que afectando principalmente en la pared del vaso y órganos y corazón. En las paredes, la alteración estructural se relaciona en un primer momento a los cambios mecánicos ocasionados por el aumento del estrés vascular y de presión. Las localizaciones más sensibles a lesión endotelial y son los segmentos vasculares con bifurcación, en que el flujo es más turbulento y presentan mayor oscilación de estrés. En el corazón, la RA provoca un aumento de la carga en los ventrículos, reduciendo su eficiencia en la eyección y perfusión cardíaca. Esto ocasiona que el sistema vascular presente una mayor presión arterial sistólica, y por tanto una mayor sobrecarga. La prolongación crónica de esta situación induce a una hipertrofia del miocardio aun existiendo una presión arterial normal (73–75).

El incremento de RA es un importante factor de riesgo predictivo independiente de morbilidad y mortalidad de origen vascular y está asociado a numerosos factores de riesgo vasculares (76–84). En población de bajo riesgo existe una relación fisiológica entre la edad y la RA (85–87). En cambio, se ha observado que la magnitud de este incremento de RA puede variar en función de la carga de riesgo cardiovascular. En particular, se ha observado que la RA aumenta de forma prematura en pacientes con DM tipo 2 hasta llegar a una meseta funcional (88,89). El SMet acelera el proceso de RA (81,90–94). Sin embargo, aún no se conoce de manera exacta los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al SMet que contribuyen a la RA.

Existen distintos métodos de análisis e índices de RA pueden diferenciarse según la valoren de forma sistémica, regional, local o a partir de las reflexiones de onda (95). Entre ellos destacan los índices basados en el análisis de la reflexión de la onda de presión arterial entre la fase sistólica y diastólica, los índices basados en la distensión vascular calculados a partir de la diferencia de diámetro del vaso en fase sistólica y diastólica. Sin embargo, uno de índices de RA más utilizados es el basado en la medición de la velocidad de onda del pulso (VOP) entre dos puntos. La VOP, inicialmente descrita por Bramwell and Hill (96), depende de la densidad de la sangre, del área intraluminal por la que transcurre y de la compliancia de la pared del vaso. Su principio se basa en que la presión del pulso generada por la eyección ventricular es propagada a través del árbol vascular a una determinada velocidad que es determinada por la geometría y las propiedades elásticas de la pared arterial. De este modo, la VOP se define por la ecuación de Moens-Korteweg, de forma que $VOP = \sqrt{Eh/2\rho R}$, donde E corresponde al Young's Modulus de la pared arterial, h es el grosor de la pared, ρ es la densidad de la sangre y R corresponde al radio arterial al final de la diástole.

Una versión simplificada y de mayor utilidad clínica para la valoración de la VOP consiste en la obtención de la cuantificación del flujo en dos puntos separados a una determinada distancia. A partir de estas mediciones se puede obtener la VOP de forma que $VOP = \Delta x / \Delta t$ en que Δx equivale a la distancia entre los dos puntos de medición y Δt corresponde al tiempo de transito del pulso entre los dos puntos.

2.1.3 Cuantificación de la Rigidez Arterial: Limitaciones de los Métodos Convencionales

El patrón oro para para la estimación de la RA consiste en la medida de la VOP en aorta mediante ecografía o transductor por presión medida a partir de la distancia entre la arteria carótida y arteria femoral (figura 3) (95,97). Esta técnica tiene como principal ventaja su bajo coste, accesibilidad y relativa rapidez. El incremento de la VOP en aorta es un predictor independiente de morbi-mortalidad de origen vascular (76,78,79,81,82) y se ha asociado a la HTA (83,98), el incremento del GIM en arteria carótida (99), la insuficiencia renal (100), la DM (84) y al SMet (94).

Sin embargo, el valor de la VOP en aorta para la clasificación del riesgo cardiovascular parece ser limitado (98,101–104). Especialmente en aquellos individuos en que coexistan distintos componentes del SMet, dado que las variaciones de VOP en aorta se explican principalmente por la edad y la HTA (105). Además, el aumento de la rigidez en aorta ocurre en fases relativamente avanzadas de arteriosclerosis, lo que limita su utilidad en la clasificación del riesgo en las etapas más iniciales del proceso. Por estos motivos, existe un creciente interés en poder identificar incrementos prematuros de RA en segmentos vasculares más sensibles y poder determinar estados de arteriosclerosis más incipientes (106).

Por otro lado, aunque están ampliamente aceptadas y validadas, los métodos convencionales para la medición de la VOP tienen importantes limitaciones. En primer lugar, estos métodos no permiten la medición de la VOP de segmentos vasculares específicos, limitándose a grandes segmentos vasculares muy distantes entre sí. De este modo, la VOP obtenida resulta de la media de un largo trayecto vascular compuesto por arterias de distinta composición muscular y elástica. En cambio, para que la estimación de RA sea más precisa es preferible poder acceder a segmentos vasculares más cortos y específicos.

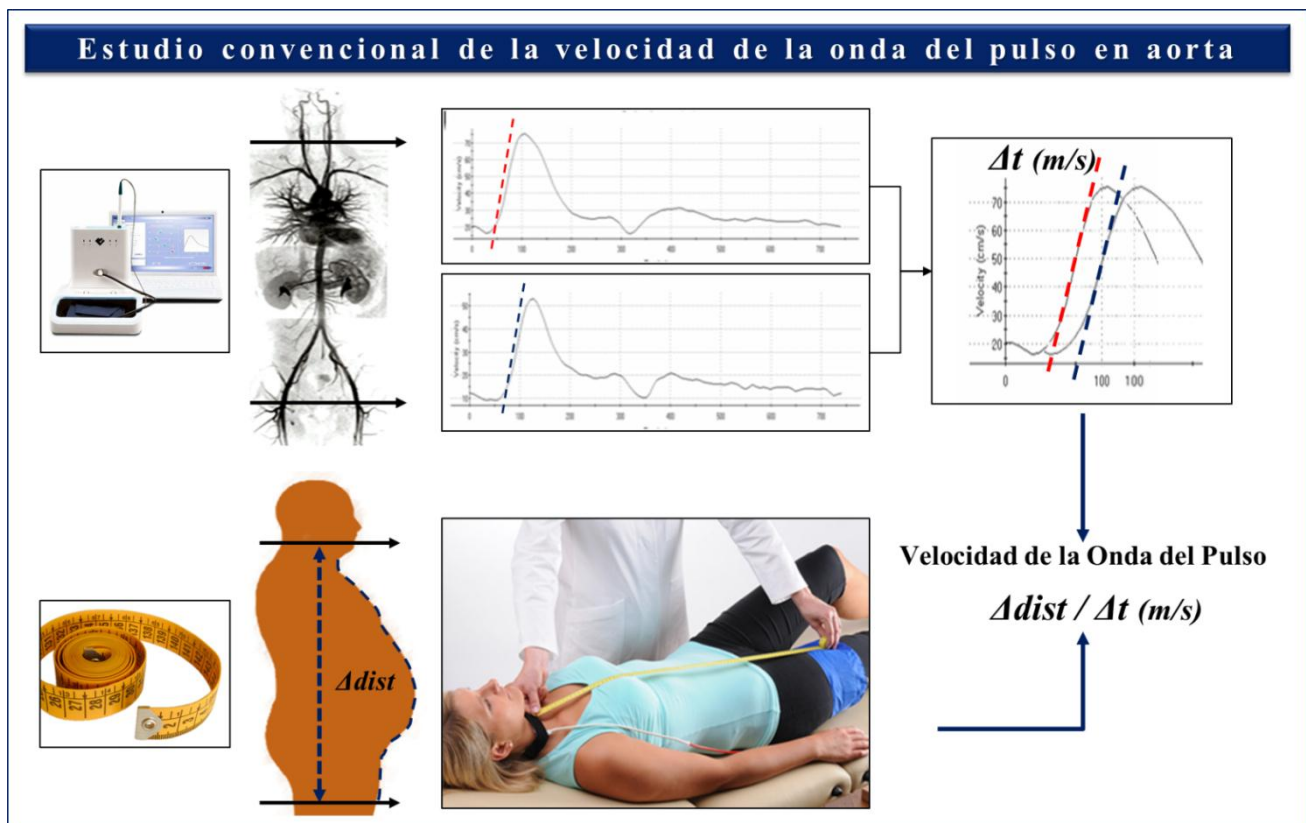


Figura 3. Estudio convencional de la velocidad de la onda del pulso en aorta mediante el método convencional. Mediante tonómetro por presión o transductor de ecografía se obtienen las curvas de velocidad del flujo en arteria carótida y femoral. Mediante cinta métrica se estima la distancia o recorrido que existe entre los dos puntos de medición. Finalmente la velocidad de la onda del pulso es calculada a partir del producto de la distancia por la diferencia de tiempo entre las mediciones flujo.

También cabe considerar el error inducido dado que en estas técnicas no se cumplen las hipótesis de formulación de la VOP descritas, en la cual sólo se puede atribuir a tubos cilíndricos infinitamente largos y cuyas paredes son de grosor uniforme. Finalmente, la medida de la distancia entre los puntos se realiza de manera manual con cinta métrica y por encima de la superficie corporal. Esto da lugar a importantes errores sistemáticos en la medida de la VOP puesto que simplemente se realiza una cruda aproximación al trayecto vascular (107).

2.2 Depósito de Hierro Tisular: Marcador de Riesgo Metabólico y Neurocognitivo

El hierro es un elemento esencial implicado en el transporte de oxígeno, estrés oxidativo y metabolismo celular aeróbico. Se almacena principalmente en ferritina y hemosiderina que sirven como amortiguador frente al déficit o exceso de hierro. Ejerce un papel fundamental en el proceso oxidativo de los tejidos como regulador del acúmulo de lípidos y su oxidación. Este elemento es precursor de radicales hidroxilos altamente reactivos a la reacción de Fenton que dan lugar al estrés oxidativo y a la peroxidación de lípidos que contribuyen al daño tisular (108). Existe una creciente evidencia que pone de manifiesto el potencial rol del hierro, y especialmente a su excesivo acúmulo tisular, como factores subyacentes a la patogénesis de la RI, la EGHNA, la ECV y a algunos trastornos neurodegenerativos (32–35,37,108–112). Esto ha suscitado un gran interés en determinar el rol del depósito de hierro tisular en el desarrollo de las manifestaciones del SMet.

2.2.1 Depósito de Hierro Hepático y Esteatosis: Marcadores de Riesgo Metabólico

El hígado tiene un rol principal en el metabolismo del hierro siendo el órgano regulador y de mayor capacidad para su almacenamiento. Existe una relación sinérgica entre el depósito lipídico y el DHH. La sobrecarga de DHH induce el aumento de la peroxidación lipídica y estrés oxidativo que provoca el deterioro del proceso de lipogénesis, mayor RI y fibrosis hepática (108). En individuos con prediabetes y DM tipo 2 se ha observado que el aumento del DHH contribuye al incremento del depósito lipídico en el hígado (38,39).

Así mismo, en presencia de la EHGNA el DHH se ha asociado a la progresión de la esteatosis simple a la esteatohepatitis (113,114). El mecanismo exacto de la progresión de la EHGNA no es del todo conocido aunque probablemente incluye dos procesos: 1) uno relacionado con el acúmulo excesivo de triglicéridos en el hepatocito y 2) otro relacionado con un incremento del estrés oxidativo que origina un incremento de la necrosis celular y una activación de las células de Ito, ambos desencadenantes de la fibrosis y progresivamente la cirrosis hepática. Se han descrito algunos de los factores responsables del depósito de hierro en la EHGNA como son factores genéticos, RI y la eritrofagocitosis de las células de Kupffer. Sin embargo, no existe aún una clara evidencia de la relación entre el DHH y los mecanismos patogénicos de la EHGNA (108,115).

2.2.2 Depósito de Hierro Cerebral: Marcador de Riesgo Neurocognitivo

En el cerebro el hierro está implicado en el transporte de oxígeno, la producción de mielina, la síntesis de neurotransmisores, así como al estrés oxidativo. No obstante, este alto requerimiento de hierro converge con la alta susceptibilidad al daño cerebral provocado por la peroxidación que genera el hierro (116,117).

El acúmulo de radicales libres de hierro en sustancia gris, debido a un exceso del proceso oxidativo, puede dar lugar a un deterioro cognitivo precoz y a una serie de trastornos neurodegenerativos (34). En modelos animales y humanos que depósito de hierro cerebral (DHC) se ha asociado a un deterioro cognitivo, y se ha identificado como un potencial factor subyacente a algunos trastornos neurodegenerativos como son la enfermedad de Parkinson, Alzheimer o Huntington (34,35). El DHC ocurre con la edad, especialmente a partir de los 40 años y el mayor acúmulo se localiza en ganglios basales (116). Sin embargo, existe una creciente evidencia de que existen otros factores subyacentes que pueden actuar como precursores del DHC. De este modo, se ha demostrado que la obesidad inducida por la dieta aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno en el cerebro que promueven peor rendimiento cognitivo (118). Así mismo, en ancianos se ha observado una correlación positiva entre el incremento del DHH y DHC (119).

La presencia del SMet y sus componentes se asocia a cambios estructurales y funcionales del tejido cerebral que inducen a una pérdida de la capacidad cognitiva y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (40–43). Sin embargo, existe escasa evidencia de la relación que pueda existir entre los componentes del SMet y el incremento DHC y de cómo éste puede repercutir en el rendimiento cognitivo.

2.2.3 Cuantificación de la Esteatosis y Depósito de Hierro Tisular: Limitaciones de los Métodos Convencionales

El examen histológico mediante biopsia es el patrón de oro para cuantificar el contenido lipídico o de hierro tisular. No obstante, su carácter invasivo y coste, no resulta un método apropiado para ser aplicado a estudios longitudinales ni en sujetos sanos. Por todo ello, se han propuesto distintos marcadores de modalidades no invasivas también útiles para su estimación y monitorización.

Por su carácter no invasivo, bajo coste, inocuidad y alta disponibilidad, la ecografía es el método más accesible para la estimación del depósito lipídico en el hígado y el diagnóstico de la EHGNA; sin embargo su potencial diagnóstico depende del grado de experiencia del operador. Además, sólo permite una valoración cualitativa, clasificando la esteatosis en 3 estadios en función del grado de ecogenicidad del hígado: *Grado leve*, incremento de la ecogenicidad del hígado respecto la corteza renal o el parénquima esplénico con buena visualización vascular hepática; *Grado moderado*, pobre visualización vascular hepática; *Grado severo*, dificultad para visualizar el diafragma (Figura 4). Estudios previos han reportado unas tasas de sensibilidad del 60-94% y especificidad del 84-95% en la detección de esteatosis hepática (120–122).

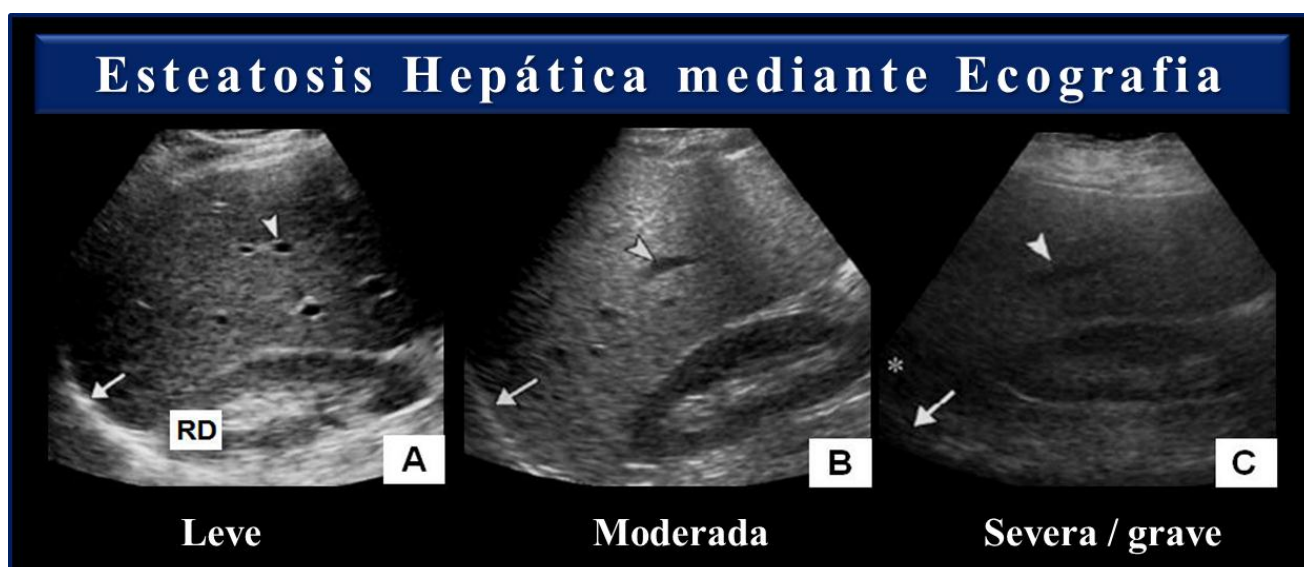


Figura 4. Estudio de la esteatosis hepática mediante ecografía. La ecografía únicamente permite la valoración cualitativa de la esteatosis y su severidad a partir de la relación ecogénica entre hígado y la corteza renal.

Por otro lado, los valores en sangre de la ferritina y otros marcadores circulantes como la hemosiderina, transferrina o saturación de transferrina son utilizados para la monitorización del metabolismo del hierro. No obstante, estos marcadores circulantes no constituyen por sí mismos una estimación directa del depósito tisular. Tampoco son útiles para discriminar la concentración de hierro que pueda existir en distintos órganos. Además, existen diversos factores como son la inflamación y el tratamiento farmacológico que pueden alterar sus valores.

2.3 Biomarcadores de Riesgo mediante Resonancia Magnética

La RM es una modalidad de diagnóstico por la imagen que permite el estudio de los tejidos de manera no invasiva y sin radiaciones ionizantes (Figura 5). El fenómeno de la RM se basa en un complejo mecanismo basado en la señal producida por los núcleos de hidrógeno en interacción con ondas de radiofrecuencia y que están sometidos a un alto campo magnético.

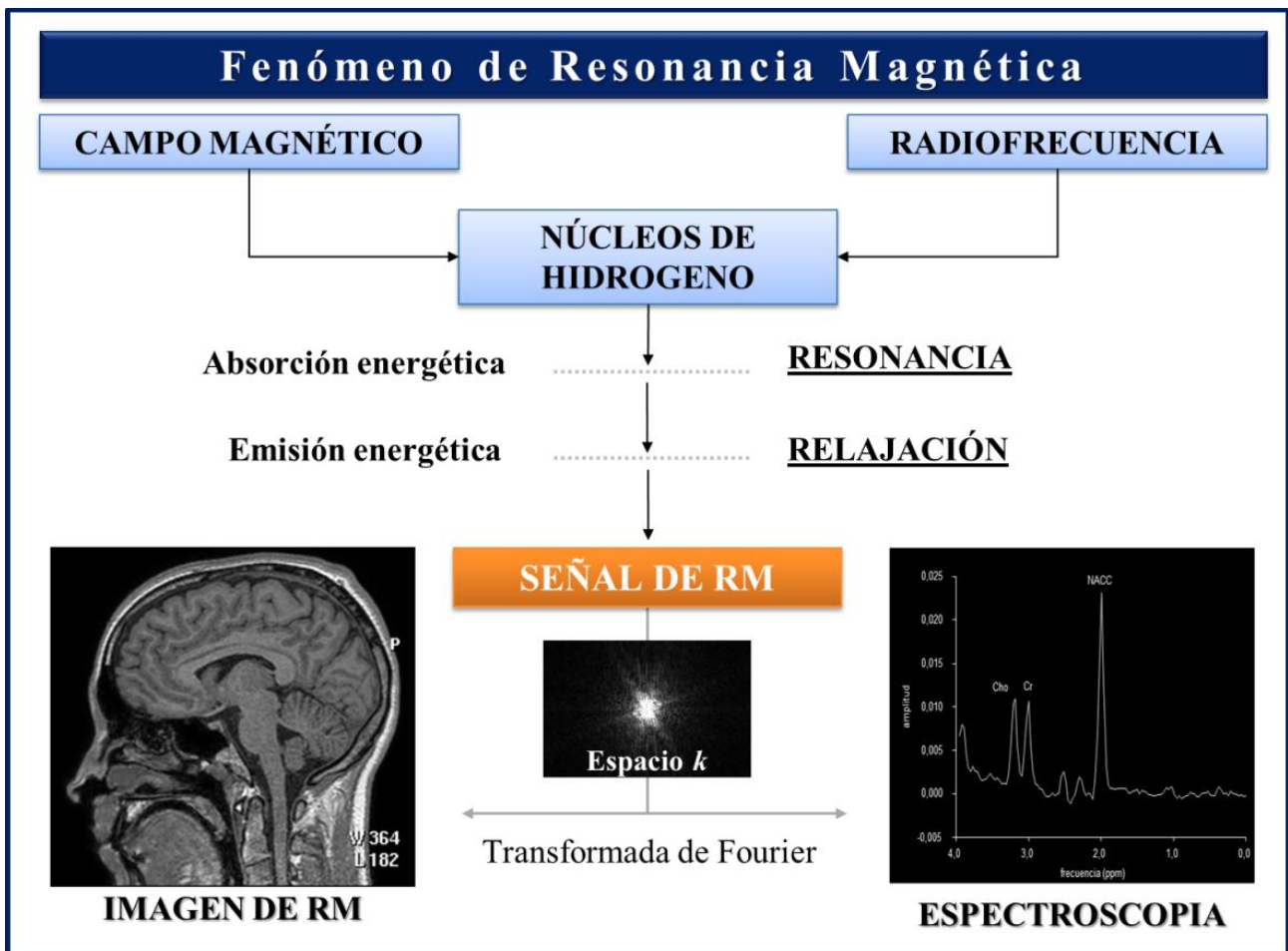


Figura 5. El fenómeno de la resonancia magnética. La resonancia magnética es una modalidad de imagen que permite el estudio de los tejidos de manera no invasiva y sin utilizar radiación ionizante. El fenómeno se basa en la capacidad de absorción y emisión de energía de radiofrecuencia de los núcleos de hidrógeno que están sometidos bajo un potente campo magnético. La liberación de energía por parte de los núcleos de hidrogeno es recogida en forma de señal analógica y almacenada en el espacio k. Esta señal puede ser representada en forma de imagen o espectroscopia a partir de algoritmos basados en la transformada de Fourier.

La RM se caracteriza principalmente por ser la herramienta diagnóstica de mayor versatilidad permitiendo ofrecer información morfológica, fisiológica, funcional y metabólica. Esta versatilidad permite a la RM tener la capacidad de realizar un abordaje multiparamétrico y multiorgánico de las distintas manifestaciones fisiopatológicas que se dan en presencia del SMet y sus componentes.

2.3.1 Estudio de la Velocidad de la Onda del Pulso

La RM ha demostrado ser una herramienta precisa y reproducible para la obtención de la VOP en modelos artificiales (123,124), arterias pulmonares (125,126) y aorta (127,128). La VOP es cuantificada mediante la técnica angiográfica en contraste de fase 2D con sincronización cardíaca retrospectiva. Dicha técnica se basa en la aplicación de un gradiente bipolar que genera una diferencia en el desfase de los espines estáticos (tejido estacionario) respecto los espines en movimiento (sangre). Este desfase es proporcional a la velocidad y a la dirección del flujo lo que permite cuantificar el paso de flujo sanguíneo en un determinado corte y a lo largo del ciclo cardíaco.

La RM ha sido utilizada para la medición de la VOP en aorta en pacientes con DM (129,130), HTA (131), obesidad (132), SMet (133) y fumadores (134). Sin embargo, su principal ventaja respecto a los métodos convencionales radica en la posibilidad de poder medir la VOP de manera directa en segmentos vasculares específicos e inaccesibles en otras modalidades. Además, permite la determinación exacta de la longitud del segmento analizado indistintamente de la fisionomía o composición del individuo. Esto es relevante dado que el potencial valor predictivo del aumento de la RA en segmentos específicos es un punto clave de interés para la evaluación precoz del riesgo cardiovascular. Así pues, estudios de RM han podido determinar que la medida de RA en arco aórtico es más sensible que la medida de RA aórtica global para determinar daño cerebral (131), rigidez subclínica (86), tolerancia a la glucosa (135) o bajas concentraciones de colesterol HDL (133).

Estudios previos han demostrado la viabilidad del análisis de la VOP en arteria carótida común mediante RM (figura 6), subrayando la necesidad de establecer cuál puede ser su potencial rol en la clasificación del riesgo cardiovascular (136,137). La arteria carótida es un segmento vascular muy relevante habitualmente afectado por la aterosclerosis y la RA que aumentan el riesgo de infarto cerebral (138–140). Sin embargo, no existen estudios que analicen la VOP mediante RM en arteria carótida común y la influencia que ejercen los componentes del SMet sobre la misma.

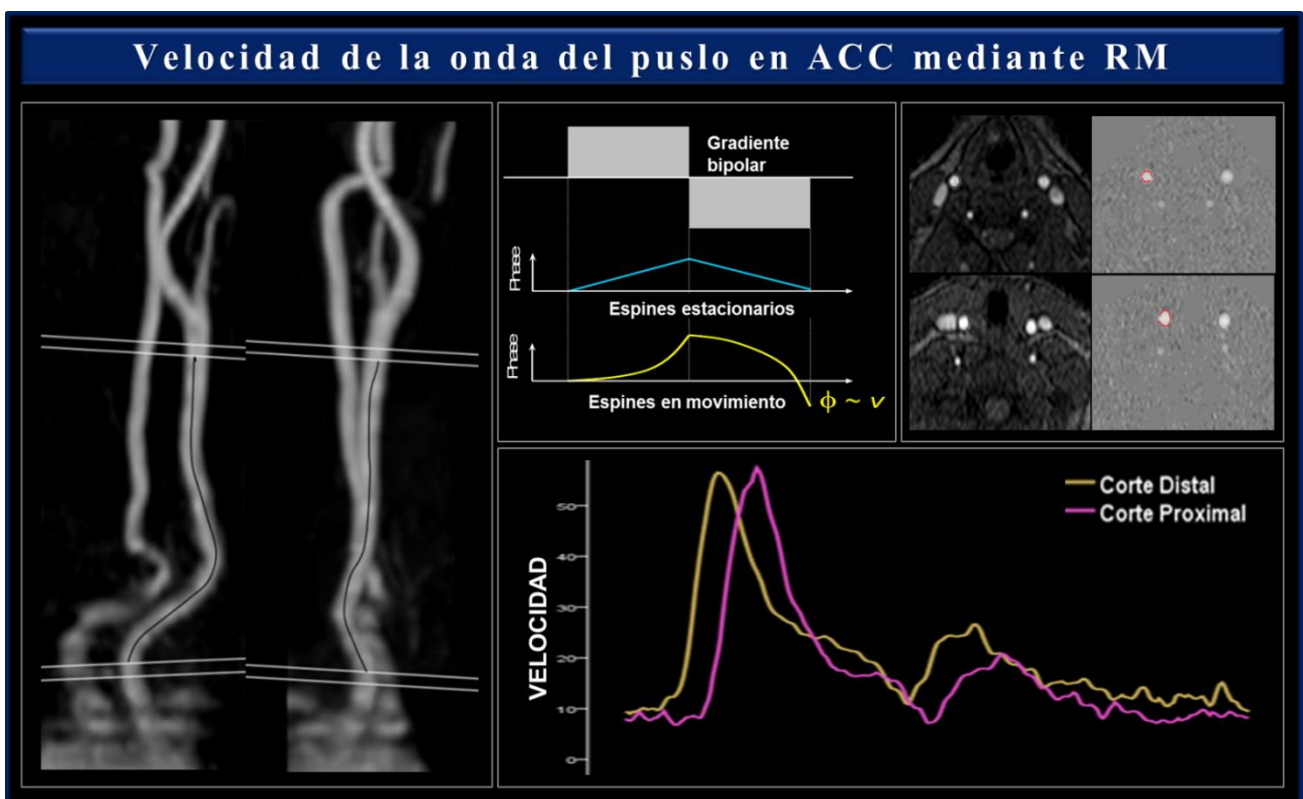


Figura 6. Estudio de la velocidad de onda del pulso en arteria carótida común mediante resonancia magnética. La resonancia magnética es la única modalidad de imagen que permite el análisis de la VOP en segmentos vasculares cortos y específicos como la arteria carótida común. La aplicación de un gradiente bipolar provoca un desfase de los espines proporcional a la velocidad del flujo y que es representada en imagen en escala de grises. A partir de la cuantificación de la velocidad del flujo a lo del ciclo cardiaco puede ser calculada la VOP entre los dos puntos de corte.

2.3.2-1 Estudio de la Esteatosis Hepática

La RM se ha establecido como una de las herramientas más precisas para el estudio del contenido lipídico hepático (141,142). Su principal ventaja radica en que es la única modalidad que permite realizar el estudio cuantitativo del depósito lipídico de manera no invasiva (Figura 7). Aunque existen muchas técnicas de RM que permiten la cuantificación de la grasa, todas ellas se basan en la explotación de la diferencia de precesión que existe entre el agua y la grasa (210Hz en 1.5T). Principalmente se puede distinguir dos métodos distintos.

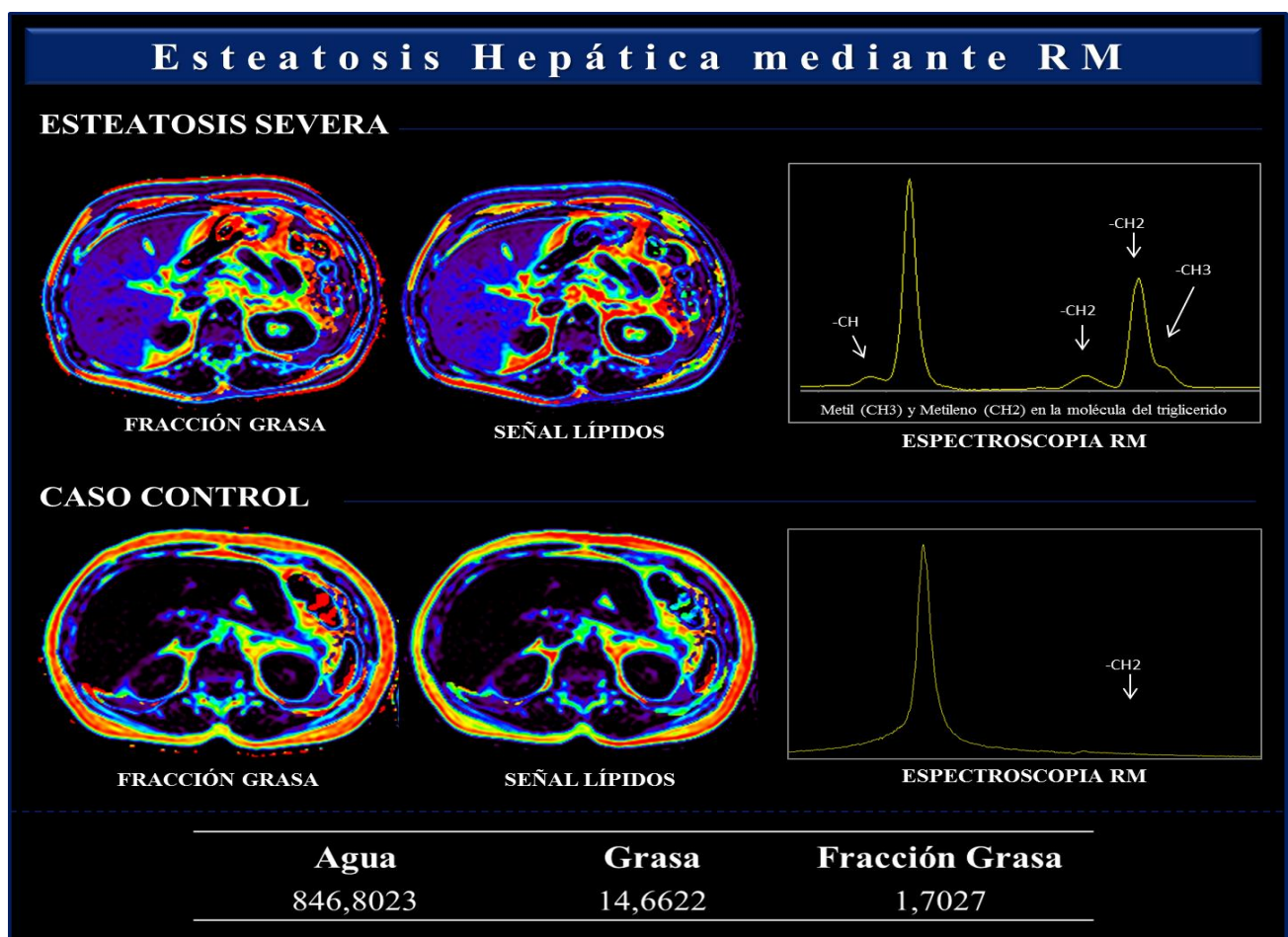


Figura 7. Estudio de la esteatosis hepática mediante resonancia magnética. La resonancia magnética permite el estudio cuantitativo y cualitativo de la esteatosis hepática mediante el método Dixon (imagen) y espectroscopia. La presencia de esteatosis provoca una elevación de señal (en imagen y espectroscopia) que es proporcional al depósito lipídico. A partir de la cuantificación de la variación de señal puede ser calculada la fracción grasa de un determinado tejido.

Espectroscopia por RM: considerada el método de referencia para la cuantificación de la grasa intrahepática de manera no invasiva. Los resultados obtenidos mediante espectroscopia por RM han mostrado fuertes correlaciones con el grado histológico de esteatosis con unos índices de sensibilidad del 87-100% y especificidad del 90-100% 15-17 (143–148). Se diferencia de la RM convencional en forma que presenta la información del espectro de componentes bioquímicos correspondientes a los principales metabolitos presentes en un tejido. El depósito lipídico puede ser diferenciado porque su diferente composición química hace que su frecuencia de resonancia también sea distinta. La espectroscopia por RM tiene la capacidad para detectar y cuantificar pequeñas cantidades de lípidos intrahepáticos que serían imperceptibles por otras modalidades de imagen (149–151). Sin embargo, su principal inconveniente radica en que su estudio se limita a un único voxel de adquisición sin poder ofrecer información del hígado completo.

Método Dixon: descrito por Dixon en 1984 (141) se basa en el desplazamiento químico producido por el agua y la grasa. El depósito lipídico se estima a partir de la variación de señal obtenida en imágenes potenciadas en T1 en fase y fase-opuesta. En las imágenes en fase la señal viene determinada por la cantidad de agua y grasa, mientras que en las imágenes en fase opuesta la señal de grasa es sustraída a la del agua. Dado que la diferencia de señal entre las imágenes viene determinada por el contenido lipídico en un determinado voxel, la fracción de grasa puede ser cuantificada. Actualmente, se han desarrollado nuevas técnicas basadas en el método Dixon que incluyen la obtención de más imágenes en fase y fuera fase que permiten corregir los errores en la medida inducidos por el efecto de caída de señal de T2* (152–154). El cálculo del depósito lipídico mediante el método Dixon y sus variantes se asocian a los resultados obtenidos en espectroscopia y a el grado histopatológico de esteatosis aunque la magnitud de la correlación varía en función de la técnica Dixon utilizada (153).

2.3.2-2 Estudio del depósito de hierro tisular

La introducción del cálculo cuantitativo del depósito de hierro mediante RM ha tenido un impacto profundo en el conocimiento y manejo de las manifestaciones que afectan a sobrecarga de hierro tisular, especialmente aquellas que afecta al corazón, hígado y cerebro (117,155–157).

La RM ha demostrado ser una herramienta precisa y reproducible para la cuantificación del depósito de hierro en hígado, páncreas, cerebro, corazón e incluso en cartílago (156,158–164). La principal ventaja de la RM es su inocuidad y alta reproducibilidad, mostrando una variabilidad intraobservador casi insignificante y una variabilidad entre equipos muy baja (165,166). Esto ha dado lugar a que actualmente la RM sea considerada una herramienta fundamental en todos los ensayos clínicos basados en la quelación del hierro así como en el manejo diagnóstico y clínico de las alteraciones del hierro como la talasemia.

El cálculo del depósito de hierro tisular mediante RM se basa en los cambios en los tiempos de relajación inducidos por la heterogeneidad del campo magnético local y las propiedades intrínsecas del tejido (figura 8). Las células con alto contenido en hierro, elemento paramagnético, inducen un gradiente de variación que provoca el desplazamiento aleatorio de fase de los protones de hidrógeno, afectando así su tiempo de relajación. De este modo, la señal de relajación en cada tejido queda en parte afectada por la contribución del depósito de hierro. Sin embargo, se considera que las únicas formas de hierro que tienen un efecto paramagnético suficientemente fuerte como para afectar significativamente a la señal de RM se concentran en la de ferritina y hemosiderina (117,167).

Existen distintos métodos mediante los cual la RM puede determinar el depósito de hierro en un determinado órgano o tejido (117). Uno de los principales métodos está basado en el análisis de la caída de señal T2*. Esta técnica se basa en la adquisición de imágenes en distintos tiempo de eco en que la señal del varía en función de la susceptibilidad magnética del tejido.

El análisis de la intensidad de señal en las distintas imágenes permite calcular la caída exponencial de señal en $T2^*$ de modo que $IS(t) = IS_0 e^{-t/T2^*}$. Posteriormente, mediante el cálculo de $1000/T2^*$ se obtiene el valor de $R2^*$ que es expresado en hercios. Los valores de $R2^*$ han sido ampliamente correlacionados con el depósito de hierro tisular por lo que son utilizados como marcador indirecto de concentración de hierro en un determinado tejido (117,156,168).

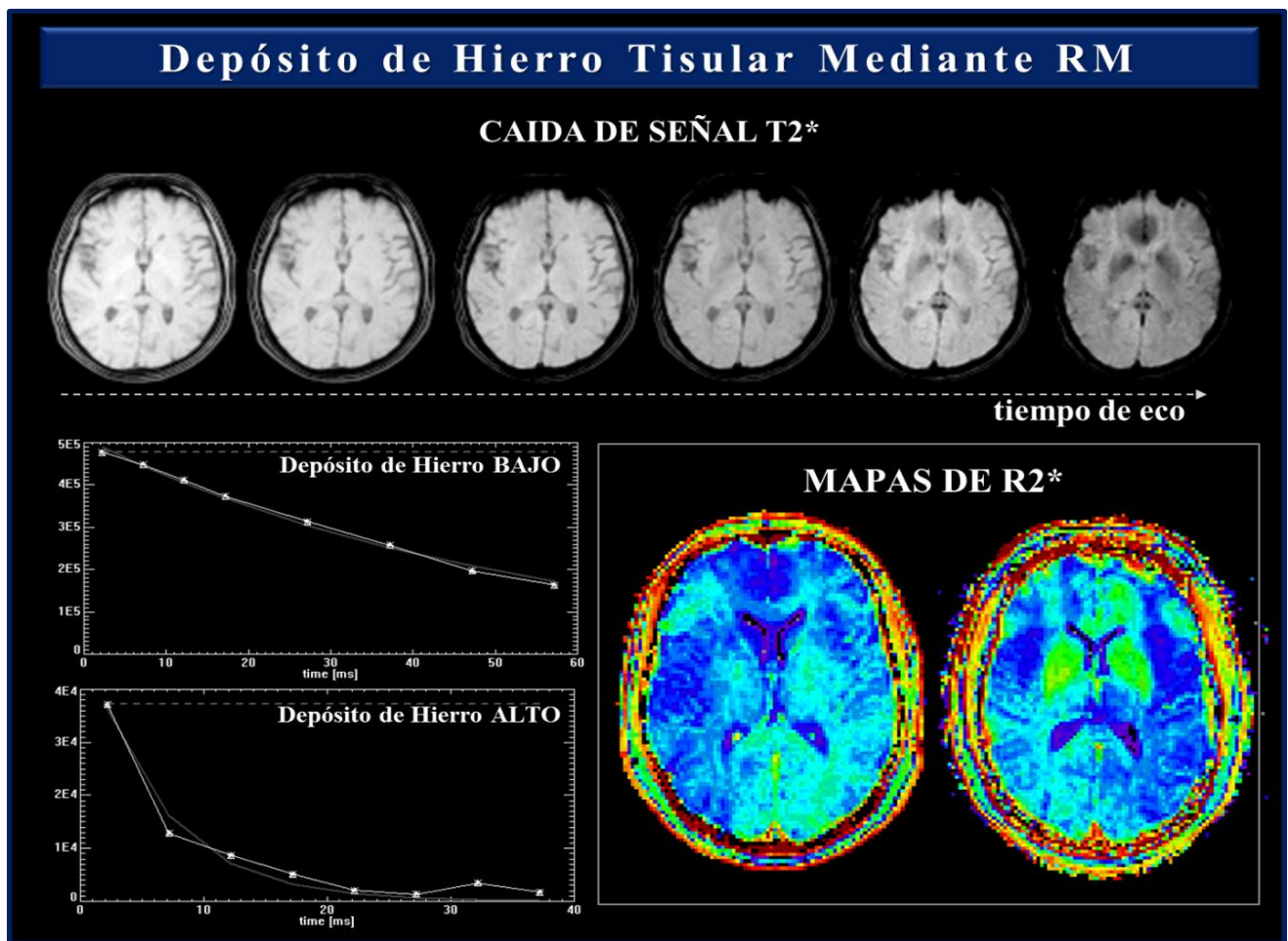


Figura 8. Estudio del depósito de hierro tisular mediante resonancia magnética. Existen distintos métodos de resonancia magnética que permiten calcular o estimar el depósito de hierro tisular. Uno de los métodos más utilizados está basado en la caída de señal en $T2^*$. Dado que el depósito de hierro provoca una mayor caída de señal $T2^*$, éste puede ser estimado a partir del cálculo del valor exponencial $R2^*$ y expresado en Hz. Los mapas de $R2^*$ corresponden a dos sujetos sin (izquierda) y con (derecha) depósito de hierro en núcleos caudados y lenticular.

Otro método de cálculo de DHH específico para el hígado consiste en el descrito inicialmente por Gandon y cols. (169) y posteriormente optimizado con dos tiempos de eco por Alustiza y cols. (160). Este método permite calcular de manera directa el DHH a partir de la variación de señal hepática en dos imágenes obtenidas en distintos tiempo eco. En esta técnica la variación de señal en hígado es normalizada por la intensidad de señal del músculo paravertebral.

El depósito de hierro mediante RM ha sido ampliamente correlacionado con marcadores circulantes de hierro y con determinadas alteraciones patológicas incluyendo la talasemia, hemocromatosis y algunos trastornos neurodegenerativos (111,155,170–172). Sin embargo, estudios recientes ponen de manifiesto la utilidad del cálculo de hierro mediante RM para el estudio de las manifestaciones precoces que afectan al SMet y a sus componentes. En concreto, la RM ha sido utilizada para identificar un mayor DHH en pacientes con prediabetes y DM (38). Así como para determinar que parte de la variación entre la grasa hepática y la sensibilidad a la insulina viene explicada por el DHH (39).

Debido a la capacidad para medir el depósito de hierro en distintos tejidos, la RM también ha contribuido a determinar la correlación positiva que existe entre el DHH y el DHC en ancianos (119). No obstante, aún existe escasa evidencia de los factores de riesgo que contribuyen al incremento del depósito de hierro tisular y de su potencial impacto metabólico y/o cognitivo en presencia del SMet. Así pues, la RM puede ser de utilidad para identificar los factores del riesgo del SMet que contribuyen al incremento del DHH y DHC y para evaluar su impacto metabólico y cognitivo.

Capítulo 3

Hipótesis y Objetivos

La presente tesis parte de la hipótesis general que biomarcadores de RM de daño estructural o metabólico preclínico pueden permitir mejorar la clasificación y monitorización del riesgo cardiovascular, metabólico y neurocognitivo asociado a la presencia del SMet y sus componentes. De esta hipótesis general derivan las siguientes **hipótesis específicas**:

1. El estudio de la velocidad de la onda del pulso en arteria carótida mediante RM puede contribuir a determinar el riesgo cardiovascular asociado al SMet y a identificar los componentes del SMet que más contribuyen a la arteriosclerosis carotídea subclínica.
2. El estudio del depósito de hierro mediante RM puede permitir identificar los factores que más contribuyen al acúmulo de hierro tisular y a determinar el riesgo metabólico y neurocognitivo asociado a la obesidad.

Rigidez Arterial en Carótida y Depósito Tisular de Hierro mediante Resonancia Magnética

De las hipótesis específicas planteadas se desprenden los siguientes **objetivos** en relación al riesgo cardiovascular asociado al síndrome metabólico:

1. Determinar la asociación que existe entre el aumento de la velocidad de onda del pulso en arteria carótida común mediante RM y la presencia del SMet en sujetos libres de enfermedad cardiovascular isquémica o diabetes.
2. Identificar los componentes del SMet que más contribuyen a al aumento de la de la velocidad de onda del pulso en arteria carótida común mediante RM en sujetos libres de enfermedad cardiovascular isquémica o diabetes.

Y los siguientes **objetivos** en relación al riesgo metabólico y neurocognitivo asociado a la obesidad:

1. Identificar los componentes del SMet que contribuyen al incremento del depósito de hierro hepático y cerebral en sujetos con obesidad.
2. Evaluar el impacto cognitivo del incremento del depósito de hierro hepático y cerebral mediante RM en sujetos con obesidad.

Capítulo 4

Artículos Publicados

Blasco G, Balocco, Josep Puig, Wifredo Ricart, Sánchez-González J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Pedraza S, Fernández-Real JM. **Carotid Pulse Wave Velocity by Magnetic Resonance Imaging is increased in Middle-aged Subjects with the Metabolic Syndrome.** *Int J Cardiovasc Imaging*. 2014 [Epub ahead of print]. ISSN, 1569-5794; Factor de Impacto, 2.64.

Blasco G, Balocco S, Josep Puig, Wifredo Ricart, Sánchez-González J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Pedraza S, Fernández-Real. "Carotid pulse wave velocity by magnetic resonance imaging is increased in middle-aged subjects with the metabolic syndrome". *Int J Cardiovasc Imaging*. Vol. 31, Issue 3, (March 2015) : 603-612

<http://dx.doi.org/10.1007/s10554-014-0578-6>

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10554-014-0578-6#>

Received: 30 June 2014 / Accepted: 19 November 2014 / Published online: 26 November 2014

© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract

Arterial pulse wave velocity (PWV), an independent predictor of cardiovascular disease, physiologically increases with age; however, growing evidence suggests metabolic syndrome (MetS) accelerates this increase. Magnetic resonance imaging (MRI) enables reliable noninvasive assessment of arterial stiffness by measuring arterial PWV in specific vascular segments. We investigated the association between the presence of MetS and its components with carotid PWV (cPWV) in asymptomatic subjects without diabetes. We assessed cPWV by MRI in 61 individuals (mean age, 55.3 ± 14.1 years; median age, 55 years): 30 with MetS and 31 controls with similar age, sex, body mass index, and LDL-cholesterol levels. The study population was dichotomized by the median age. To remove the physiological association between PWV and age, unpaired t tests and multiple regression analyses were performed using the residuals of the regression between PWV and age. cPWV was higher in middle-aged subjects with MetS than in those without ($p = 0.001$), but no differences were found in elder subjects ($p = 0.313$). cPWV was associated with diastolic blood pressure ($r = 0.276$, $p = 0.033$) and waist circumference ($r = 0.268$, $p = 0.038$). The presence of MetS was associated with increased cPWV regardless of age, sex, blood pressure, and waist ($p = 0.007$). The MetS components contributing independently to an increased cPWV were hypertension ($p = 0.018$) and hypertriglyceridemia ($p = 0.002$). The presence of MetS is associated with an increased cPWV in middle-aged subjects. In particular, hypertension and hypertriglyceridemia may contribute to early progression of carotid stiffness

Keywords

Metabolic syndrome; Arterial stiffness; Pulse wave velocity; Carotid artery; Magnetic resonance

Blasco G, Puig J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Xifra G, Fernández-Aranda F, Pedraza Salvador, Ricart W, Portero-Otín M, Fernández-Real JM. **Brain Iron Overload, Insulin Resistance and Cognitive Performance in Obese Subjects: a Preliminary MRI Case-Control Study.** *Diabetes Care* 2014;37(11):3076-83. ISSN, 1569-5794; Factor de Impacto, 8.57.

Blasco G, Puig J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Xifra G, Fernández-Aranda F, Pedraza Salvador, Ricart W, Portero-Otín M, Fernández-Real JM. Brain Iron Overload. "Insulin Resistance and Cognitive Performance in Obese Subjects: a Preliminary MRI Case-Control Study". *Diabetes Care*, Vol. 37, Issue 11 (2014) : 3076-3083

<http://dx.doi.org/10.2337/dc14-0664>

<http://care.diabetesjournals.org/content/early/2014/08/07/dc14-0664.abstract>

© 2014 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered.

Received March 14, 2014/ Accepted July 15, 2014

Abstract

OBJECTIVE The linkage among the tissue iron stores, insulin resistance (IR), and cognition remains unclear in the obese population. We aimed to identify the factors that contribute to increased hepatic iron concentration (HIC) and brain iron overload (BIO), as evaluated by MRI, and to evaluate their impact on cognitive performance in obese and nonobese subjects.

RESEARCH DESIGN AND METHODS We prospectively recruited 23 middle-aged obese subjects without diabetes (13 women; age 50.4 ± 7.7 years; BMI 43.7 ± 4.4 kg/m²) and 20 healthy nonobese volunteers (10 women; age 48.8 ± 9.5 years; BMI 24.3 ± 3.54 kg/m²) in whom iron load was assessed in white and gray matter and the liver by MRI. IR was measured from HOMA-IR and an oral glucose tolerance test. A battery of neuropsychological tests was used to evaluate the cognitive performance. Multivariate regression analysis was used to identify the independent associations of BIO and cognitive performance.

RESULTS A significant increase in iron load was detected at the caudate nucleus ($P < 0.001$), lenticular nucleus ($P = 0.004$), hypothalamus ($P = 0.002$), hippocampus ($P < 0.001$), and liver ($P < 0.001$) in obese subjects. There was a positive correlation between HIC and BIO at caudate ($r = 0.517$, $P < 0.001$), hypothalamus ($r = 0.396$, $P = 0.009$), and hippocampus ($r = 0.347$, $P < 0.023$). The area under the curve of insulin was independently associated with BIO at the caudate ($P = 0.001$), hippocampus ($P = 0.028$), and HIC ($P = 0.025$). BIOs at the caudate ($P = 0.028$), hypothalamus ($P = 0.006$), and lenticular nucleus ($P = 0.012$) were independently associated with worse cognitive performance.

CONCLUSIONS Obesity and IR may contribute to increased HIC and BIO being associated with worse cognitive performance. BIO could be a potentially useful MRI biomarker for IR and obesity-associated cognitive dysfunction.

Capítulo 5

Discusión

Los artículos presentados ponen de manifiesto el valor potencial que puede suponer incorporar nuevos biomarcadores de imagen de RM con el objetivo de identificar de manera preclínica el riesgo cardiometabólico asociado a la obesidad y la presencia de los factores riesgo que constituyen el SMet. En particular, se utilizó la resonancia magnética para evaluar el efecto de los componentes del SMet sobre la elasticidad arterial y el depósito hierro tisular en sujetos sin antecedentes de diabetes o enfermedad vascular isquémica.

En este capítulo se repasa y discute los principales resultados de cada uno de los trabajos presentados y se concluye con la discusión conjunta incidiendo en el potencial rol y utilidad que puede tener la RM para la clasificación y manejo del riesgo cardiometabólico preclínico.

5.1 Rigidez Arterial en Arteria Carótida y su relación con el Síndrome Metabólico

La RM ha demostrado ser una herramienta precisa y reproducible para la cuantificación de la RA en tramos vasculares específicos evitando las limitaciones de los métodos convencionales (125,127,136). Esto ha dado lugar al uso de la RM para determinar el valor predictivo del incremento de la RA en segmentos vasculares específicos (86,131,133,135). Sin embargo, aún no había sido evaluada la VOP en arteria común mediante RM como biomarcador de arteriosclerosis subclínica en presencia del SMet y sus factores de riesgo. Este estudio pone de manifiesto la relación que existe entre el SMet y el aumento de la VOP en arteria carótida. En particular, la presencia del SMet fue asociada al aumento de la VOP de manera independiente a la edad, sexo o tensión arterial en sujetos de mediana edad sin antecedentes de enfermedad vascular isquémica o DM.

En este estudio se observa la asociación positiva entre la RA y la edad. Sin embargo, la magnitud de la correlación fue menor en el grupo de individuos con SMet. Este dato apoya las observaciones previas que indican que el aumento de la RA en relación a la edad es acelerado ante la presencia de determinados factores de riesgo (85,86,88). En concreto, este estudio demuestra un aumento de la RA en sujetos con SMet de mediana edad, pero no en la población mayor de 55 años. Estudios previos de ecografía también han identificado una reducción de la distensión carotídea en presencia del SMet en jóvenes y mediana edad. Esto sugiere que incluso en las primeras décadas de la vida pueden producirse importantes cambios estructurales en la arteria carótida (173,174). Contrariamente, parece que la presencia del SMet no contribuye al aumento de la RA carotídea en sujetos mayores de 55 años (175). Estos datos permiten plantear la hipótesis que la presencia preclínica del SMet durante décadas puede acelerar el aumento de la RA en arteria carótida hasta llegar a una meseta funcional en la que ya no sea posible eximir un mayor aumento (88,89,176).

La HTA e hipertrigliceridemia fueron identificados como los factores de riesgo del SMet que más contribuyen al aumento de la VOP en arteria carótida. Asimismo, la combinación de estos dos factores de riesgo fueron los que determinaban una mayor RA. Debido a su dependencia fisiológica, es bien conocido que la HTA es el factor de riesgo que más contribuye al incremento de la RA (105). Sin embargo, y en concordancia con estudios previos, también se identifica la hipertrigliceridemia como uno de los factores que contribuyen al incremento de la RA (174,177,178). De hecho, la dislipidemia junto a la obesidad es uno de los principales factores que contribuyen a la formación de aterosclerosis. El mecanismo por el cual estos factores contribuyen al aumento de la RA puede ser explicado por la degeneración de las fibras elásticas producidas por el depósito de colágeno o calcio y algunas disfunciones endoteliales. Así pues, este estudio confirma que la hipertrigliceridemia contribuye a la progresión de la RA en sujetos de mediana edad.

5.2 Depósito de Hierro Tisular y su relación con el Síndrome Metabólico

Este estudio pone de manifiesto el rol del DHH y DHC mediante RM como biomarcador de riesgo metabólico y neurocognitivo. En primer lugar se demostró el aumento del DHH y DHC en hipocampo, hipotálamo, núcleo caudado y lenticular asociado a la presencia de obesidad. Además, se identificaron la obesidad y la RI como predictores independientes del DHH y DHC. La relevancia de los resultados obtenidos radica en que se identifica por primera vez el incremento del DHC como biomarcador de empeoramiento cognitivo asociado a la obesidad.

De este modo, el estudio permite apoyar la hipótesis que en un contexto de RI y obesidad existe un incremento de DHC del que se deriva un peor rendimiento cognitivo (33,40,41). Así mismo, se subraya el potencial rol de la RM para el estudio del DHC como biomarcador precoz de la disfunción cognitiva asociada a la presencia del SMet y sus componentes.

Los componentes del SMet asociados de manera independiente al incremento del DHH fueron la obesidad, la RI y la esteatosis hepática. Estudios previos han demostrado la interrelación que existe entre estos factores de riesgo y el DHH (38,39). Sin embargo, en este estudio se identifica además que el incremento del DHH se acompaña de un incremento del DHC en caudado, hipocampo e hipotálamo del cual la obesidad y la RI son predictores independientes. Estos hallazgos sugieren que la obesidad junto a la RI producen alteraciones en el metabolismo del hierro que afectan de manera sistémica mediante el excesivo acúmulo en aquellos tejidos en que se deposita. Del mismo modo, se desprende la potencial utilidad de realizar un abordaje multiorgánico en futuros estudios o ensayos clínicos que pretendan evaluar el depósito de hierro tisular en presencia de los componentes del SMet.

Estudios previos ya han señalado la posible influencia de la obesidad y la RI sobre el DHC. En modelo animal con obesidad inducida mediante dieta se ha observado que una correlación positiva entre la progresión de la RI y el DHC en sustancia negra (179). Así mismo, ha sido descrito un aumento del DHC en ganglios basales en pacientes con fallo hepático (180). No obstante, en este estudio se muestra que el incremento del DHC en hipotálamo, hipocampo y núcleo caudado se correlaciona con peores puntuaciones en los test de velocidad motor, atención, flexibilidad cognitiva y memoria.

Los mecanismos exactos mediante los cual el DHC puede producir el empeoramiento cognitivo se desconocen. Es probable que en un contexto de alteración metabólica del hierro, su excesivo acúmulo sea precursor del incremento del estrés oxidativo provocando muerte neuronal y disfunción cognitiva (118). Por lo tanto cabe considerar que las funciones cognitivas reguladas por aquellas regiones de mayor DHC se vean afectadas. Del mismo modo, el daño estructural ocasionado en estos núcleos podría producir una interrupción de las proyecciones corticales que podrían explicar parte del peor rendimiento cognitivo observado en los sujetos obesos.

Finalmente, este estudio demuestra el potencial valor de la RM como biomarcador de depósito de hierro tisular pudiendo ser de gran utilidad para evaluar cambios estructurales y funcionales preclínicos en sujetos con el SMet y sus componentes.

5.3 El rol de la RM para la clasificación del riesgo cardiometabólico preclínico

La RM permite el estudio de los tejidos de manera no invasiva mediante la aplicación de distintos pulsos de radiofrecuencia, por lo que no usa radiación ionizante. Su principal ventaja respecto otras modalidades de imagen radica en la gran capacidad para determinar distintas propiedades de un mismo tejido. En esta tesis han sido utilizados algunos biomarcadores de RM específicos de elasticidad arterial, depósito de hierro tisular y esteatosis. Sin embargo, el gran avance tecnológico que ha sufrido la RM en los últimos años está facilitando el desarrollo de nuevos biomarcadores preclínicos más precisos que tienen el valor potencial de permitir una mejor comprensión y clasificación del riesgo cardiovascular, metabólico y neurocognitivo asociado al SMet. En concreto, nuevas técnicas de cuantificación del depósito de hierro y lipídico van a poder no sólo mejorar la precisión de la medida (153), sino también podrían ser utilizados para identificar estados de oxidación lipídica en los tejidos. Así mismo, a nivel cerebral es previsible que el avance en biomarcadores de conectividad estructural y funcional mediante RM permita una mejor comprensión y monitorización de los muchos cambios estructurales y funcionales asociados al SMet. Éstos biomarcadores de RM pueden llegar a tener el impacto de, por un lado, ofrecer a la PS y PP una nueva herramienta de identificación y monitorización del riesgo asociado al SMet y por otro lado, el de introducir nuevas dianas terapéuticas que permitan un mejorar o retrasar las complicaciones clínicas del SMet.

Pese a todo, a día de hoy la RM tiene importantes limitaciones que condicionan su utilidad real para la clasificación del riesgo preclínico asociado al SMet. La primera, y quizá la más relevante, es su alto coste. En el año 2003 se estimó que el coste anual de los estudios de RM sólo era superado por las modalidades de tomografía por emisión de positrones y cateterización cardíaca (181). Otro aspecto limitante de la RM consiste en el elevado consumo de tiempo, tanto en la adquisición como en el análisis de las imágenes. Aunque estos factores no sean determinantes para la incorporación de la RM para estudios específicos o ensayos clínicos, sí que limita enormemente la accesibilidad y aplicabilidad para la monitorización de las estrategias de PS y PP.

Actualmente sólo las evaluaciones económicas, particularmente los análisis de coste-efectividad, pueden determinar y justificar la incorporación de nuevos biomarcadores de RM para la clasificación del riesgo preclínico y asintomático. Estos estudios requieren de los datos relativos al coste y de la información clínica relevante relacionada con el proceso patológico estudiado. Desafortunadamente, en un contexto de riesgo multifactorial, asintomático y probablemente de décadas de evolución impiden o dificultan el análisis del coste-beneficio que supondría incorporar la RM en la clasificación del riesgo preclínico. Así mismo, teniendo en cuenta el contexto económico actual cabe considerar la inviabilidad de que la imagen de RM preclínica pueda establecerse como herramienta diagnóstica de uso general en sujetos asintomáticos.

Este paradigma de potenciales beneficios y limitaciones obliga a plantear y definir el rol de la RM en PP y PS para que sea de utilidad en el manejo preclínico del SMet y sus componentes. En este sentido cabe considerar en primer lugar que la premisa básica que debe seguir la incorporación de cualquier nuevo biomarcador más costoso en la clasificación del riesgo preclínico. Esta premisa básica consiste en que un nuevo biomarcador debe permitir mejorar los modelos predictivos actuales de manera significativa. Un biomarcador de riesgo preclínico más avanzado, más preciso o más reproducible puede resultar de nula utilidad si no permite mejorar el valor predictivo de los modelos de riesgo.

Otro aspecto muy relevante a considerar va a ser la selección de los rangos de edad de la población diana a quienes pueda beneficiar la imagen preclínica de RM. Desde los primeros años de vida, determinados estilos de vida y la exposición a los factores de riesgo resultan determinantes para la progresión de las manifestaciones clínicas del SMet en la edad adulta. Este hecho da lugar a la necesidad de identificar el riesgo preclínico en poblaciones cada vez más jóvenes. Esto significa que los biomarcadores de RM deben ser capaces de poder identificar pequeños cambios estructurales o funcionales muy incipientes precursores de enfermedad. Asimismo, este factor es fundamental implica que contra más precoz sea el riesgo identificado, mayor será la capacidad de intervención y efectividad de la PP y PS. Asimismo, dado el carácter progresivo de la enfermedad este factor resulta fundamental dado que contra más prematura sea la identificación del riesgo, mayor será la capacidad de intervención y efectividad de la PP y PS.

Finalmente, tal y como esta tesis demuestra, los biomarcadores de RM pueden aportar un mayor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al SMet y a mejorar la clasificación del riesgo preclínico. No obstante, el nuevo conocimiento generado a partir del estudio de la imagen preclínica de RM debería ser aprovechado también para facilitar el desarrollo y validación de otros índices equivalentes mediante técnicas no invasivas y menos costosas que sí puedan ser fácilmente integradas en las rutinas asistenciales de PP y PS.

Capítulo 6

Conclusiones

Esta tesis presenta la utilidad de la RM para el estudio de las alteraciones preclínicas de riesgo cardiovascular, metabólico o neurocognitivo asociado al SMet. En concreto, expone el valor de la RM para determinar el efecto del SMet y sus factores de riesgo sobre la elasticidad arterial en arteria carótida y depósito hierro tisular en sujetos sin antecedentes de DM o enfermedad vascular isquémica. A continuación se presentan las principales conclusiones de esta tesis.

Rigidez Arterial en Carótida y Depósito Tisular de Hierro mediante Resonancia Magnética

Las principales conclusiones en relación al riesgo cardiovascular asociado al síndrome metabólico a los que esta tesis permite llegar son:

1. Existe un incremento prematuro de la VOP en arteria carótida común en presencia del SMet en sujetos de media edad. La hipertensión y la hipertrigliceridemia son los factores de riesgo del SMet que más contribuyen al incremento de la VOP en arteria carótida común.
2. El estudio de la VOP en arteria carótida común mediante RM puede ser de utilidad en la clasificación del riesgo cardiovascular en población joven o de media edad proporcionando importante información acerca de los cambios vasculares precoces asociados al SMet.

En relación al riesgo metabólico y neurocognitivo asociado a la obesidad las principales conclusiones son

1. En un contexto de RI, la presencia de la obesidad se asocia a un aumento en paralelo del depósito de hierro hepático y cerebral. La obesidad junto a la RI, además de la esteatosis en el caso del hígado, son los factores que más contribuyen al depósito de hierro tisular.
2. La sobrecarga de depósito de hierro asociado a la obesidad en hipotálamo, hipocampo y núcleo caudado se correlaciona con el empeoramiento del rendimiento cognitivo de las funciones ejecutivas.

Finalmente, esta tesis pone de manifiesto la potencial utilidad de biomarcadores de RM para evaluar y monitorizar el riesgo cardiometabólico y cognitivo preclínico asociado al SMet en sujetos sin antecedentes de diabetes o enfermedad vascular isquémica.

Bibliografía

1. Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R. Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions?: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2013;159(11):758–69.
2. Aballay LR, Eynard AR, Díaz M del P, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev.* 2013;71(3):168–79.
3. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(14):1113–32.
4. Alberti K, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome: a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006;23(5):469–80.
5. World Obesity Federation [internet]. London: World Obesity [Citado el 1 agosto 2014]. Disponible en: <http://www.worldobesity.org/>
6. Koskinen J, Magnussen CG, Taittonen L, Rasanen L, Mikkila V, Laitinen T, et al. Arterial structure and function after recovery from the metabolic syndrome: the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation.* 2010;121(3):392–400.
7. Gili J. Introducción biofísica a la resonancia magnética aplicada a la clínica. 25a Edición. Universitat Autònoma de Barcelona.
8. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med.* 2004;164(10):1066.
9. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation* 2002;106:3143–421.

10. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595–607.
11. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–53.
12. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442–43.
13. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–97.
14. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e13–18.
15. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640–5.
16. Seo HI, Cho YK, Lee WY, Rhee EJ, Sung KC, Kim BS, et al. Which metabolic syndrome criteria best predict the presence of non-alcoholic fatty liver disease? *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;95(1):19–24.
17. Shaw J, Punjabi N, Wilding J. Alberti KG and Zimmet P. Sleep-disordered breathing and type 2 diabetes A report from the International Diabetes Federation Taskforce on Epidemiology and Prevention. *Diab Res Clin Pract* 2008;81:2–12.
18. Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Chen W, et al. Increased subclinical atherosclerosis in young adults with metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(3):457–63.

- 19.** Rundek T, White H, Boden-Albala B, Jin Z, Elkind MS, Sacco RL. The metabolic syndrome and subclinical carotid atherosclerosis: the Northern Manhattan Study. *J Cardiometab Syndr* 2007;2:24–9.
- 20.** Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001, 24:683-9.
- 21.** Ford ES. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):307–12.
- 22.** McNeill AM, Rosamond WD, Girman CJ, Golden SH, Schmidt MI, East HE, et al. The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care*. 2005;28(2):385–90.
- 23.** Ninomiya JK. Association of the Metabolic Syndrome With History of Myocardial Infarction and Stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2003;109(1):42–6.
- 24.** Najarian RM, Sullivan LM, Kannel WB, Wilson PW, D’Agostino RB, Wolf PA. Metabolic syndrome compared with type 2 diabetes mellitus as a risk factor for stroke: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med* 2006;166:106–11.
- 25.** Dawber TR, Meadors GF and Moore FE. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Pub Health*. 1951; 41:279 –81.
- 26.** Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221–31.
- 27.** Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1045–50.
- 28.** Targher G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1325–30.

29. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116:1413–9.
30. Kessler A, Levy Y, Roth A, Zelber-Sagi S, Leshno M, Blendis L, et al. Increased prevalence of NAFLD in patients with acute myocardial infarction independent of BMI. *Hepatology*. 2005;42:623A.
31. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(3):434–9.
32. Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes*. 2002;51(8):2348–54.
33. Fernández-Real JM, Manco M. Effects of iron overload impact on chronic metabolic disease. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(6):513–26.
34. Schröder N, Figueiredo LS, de Lima MNM. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *J Alzheimers Dis*. 2013;34(4):797–812.
35. Altamura S, Muckenthaler MU. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis*. 2009;16: 879–95.
36. Moirand R, Mortaji AM, Loréal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet*. 1997;349(9045):95–7.
37. Mendler M-H, Turlin B, Moirand R, Jouanolle A-M, Sapey T, Guyader D, et al. Insulin resistance–associated hepatic iron overload. *Gastroenterology*. 1999;117(5):1155–63.
38. Zheng X, Jiang T, Wu H, Zhu D, Wang L, Qi R, et al. Hepatic iron stores are increased as assessed by magnetic resonance imaging in a Chinese population with altered glucose homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(4):1012–9.
39. Haap M, Machann J, von Friedeburg C, Schick F, Stefan N, Schwenzer NF, et al. Insulin sensitivity and liver fat: role of iron load. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(6):e958–61.

40. Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(10):2489–503.
41. Cholerton B, Baker LD, Craft S. Insulin, cognition, and dementia. *Eur J Pharmacol.* 2013;719(1-3):170–9.
42. Elias MF, Goodell AL, Waldstein SR. Obesity, cognitive functioning and dementia: back to the future. *J Alzheimers Dis.* 2012;30:S113–125.
43. Gustafson DR. Adiposity and cognitive decline: underlying mechanisms. *J Alzheimers Dis.* 2012;30:S97–112.
44. Brogan A, Hevey D, Pignatti R. Anorexia, bulimia, and obesity: shared decision making deficits on the Iowa Gambling Task (IGT). *J Int Neuropsychol Soc.* 2010;16:711–5.
45. Maayan L, Hoogendoorn C, Sweat V, Convit A. Disinhibited eating in obese adolescents is associated with orbitofrontal volume reductions and executive dysfunction. *Obesity.* 2011;19:1382–7.
46. Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008;29:494–511.
47. Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. entral obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology.* 2008;71:1057–64.
48. Profenno L a, Porsteinsson AP, Faraone S V. Meta-analysis of Alzheimer’s disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological psychiatry [Internet]. Elsevier Inc.;* 2010 Mar 15 [cited 2013 Jun 18];67(6):505–12.
49. Beydoun M a, Beydoun H a, Wang Y. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2008;9(3):204–18.
50. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(5):e1003–12.

51. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135:61–73.
52. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*. 2007;449:228–32.
53. Verstynen TD, Weinstein A, Erickson KI, Sheu LK, Marsland AL, Gianaros PJ. Competing physiological pathways link individual differences in weight and abdominal adiposity to white matter microstructure. *Neuroimage*. 2013;79:129–37.
54. Ryan JP, Sheu LK, Verstynen TD, Onyewuenyi IC, Gianaros PJ. Cerebral blood flow links insulin resistance and baroreflex sensitivity. *PLoS One*. 2013;8(12):e83288.
55. Thambisetty M, Beason-Held LL, An Y, Kraut M, Metter J, Egan J, Ferrucci L, O'Brien R, Resnick SM. Impaired glucose tolerance in midlife and longitudinal changes in brain function during aging. *Neurobiol Aging*. 2013;34(10):2271–6.
56. Thambisetty M, Jeffrey Metter E, Yang A, Dolan H, Marano C, Zonderman AB, et al. Glucose intolerance, insulin resistance, and pathological features of Alzheimer disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *JAMA Neurol*. 2013;70(9):1167–72.
57. Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart S Study. *Neurobiol Aging*. 2005;26S1:11–6.
58. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H and Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97:1837–47.
59. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24:987–1003.
60. Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J et al. An adaptation of the Framingham coronary risk functions to southern Europe Mediterranean areas. *J Epidemiol Comm Health*. 2003;57(8):634–8.

- 61.** Santosa R and Nasir K. Insights into atherosclerosis from invasive and non-invasive imaging studies: Should we treat subclinical atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2009;205(2):349–56.
- 62.** O’Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med*. 1999;340:14–22.
- 63.** Urbina EM, Srinivasan SR, Tang R, Bond MG, Kieltyka L and Berenson GS. Impact of multiple coronary risk factors on the intima-media thickness of different segments of carotid artery in healthy young adults: the Bogalusa Heart Study. *Am J Cardiol*. 2002;90:953–8.
- 64.** Simons PCG, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness : indicators of cardiovascular risk in high-risk patients the SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation*. 1999;100(9):951–7.
- 65.** Stein JH, Fraizer MC, Aeschlimann SE, Nelson-Worel J, McBride PE, Douglas PS. Vascular age: integrating carotid intima-media thickness measurements with global coronary risk assessment. *Clin Cardiol*. 2004;27:388–92.
- 66.** Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21:93–111.
- 67.** Roman MJ, Naqvi TZ, Gardin JM, Gerhard-Herman M, Jaff M, Mohler E. Clinical application of noninvasive vascular ultrasound in cardiovascular risk stratification: a report from the American Society of Echocardiography and the Society of Vascular Medicine and Biology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2006;19:943–54.

68. Lorenz M, Schaefer C, Steinmetz H, Sitzer M. Is carotid intima media thickness useful for individual prediction of cardiovascular risk? Ten-years results from Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Eur Heart J.* 2010;31:2041–8.
69. Barinas-Mitchell E, Kuller L, Sutton-Tyrrel K et al. Effect of Weight Loss and Nutritional Intervention on Arterial Stiffness in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29:2218–22.
70. Helfand M, Buckley DI, Freeman M, Fu R, Rogers K, Fleming C, Humphrey LL. Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009;151:496–507.
71. Simon A, Megnien JL and Chironi G. The value of carotid intima-media thickness for predicting cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:182–5.
72. O’Leary D and Bots M. Imaging of atherosclerosis: carotid intima–media thickness. *Eur Heart J.* 2010;31:1682–9.
73. Ziemann SJ. Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):932–43.
74. Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L, et al. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension.* 2009;54(5):919–50.
75. Oliver J and Webb D. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:554–66.
76. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension.* 2001;37(5):1236–41.
77. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA, et al. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation.* 2006;113(5):657–63.

- 78.** Willum Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. 2006;113(5):664–70.
- 79.** Meaume S, Benetos A, Henry OF, Rudnichi A, Safar ME. Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in subjects >70 years of age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(12):2046–50.
- 80.** Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension*. 2002;39(1):10–5.
- 81.** Mitchell GF, Hwang S-J, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010;121(4):505–11.
- 82.** Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Boudreau RM, Venkitachalam L, Kupelian V, Simonsick EM, et al. Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults. *Circulation*. 2005;111(25):3384–90.
- 83.** Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension*. 1999;33:1111–7.
- 84.** Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, Gosling RG. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation*. 2002;106(16):2085–90.
- 85.** Taniwaki H, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Kanda H, Maekawa K, et al. Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. *Vessel wall properties in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*. 1999;22(11):1851–7.
- 86.** Redheuil A, Yu W-C, Wu CO, Mousseaux E, de Cesare A, Yan R, et al. Reduced ascending aortic strain and distensibility: earliest manifestations of vascular aging in humans. *Hypertension*. 2010;55(2):319–26.

87. Kim EK, Chang S-A, Jang SY, Kim Y, Kim SM, Oh JK, et al. Assessment of regional aortic stiffness with cardiac magnetic resonance imaging in a healthy Asian population. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2013;29(S1):57–64.
88. Cameron JD, Bulpitt CJ, Pinto ES, Rajkumar C. The aging of elastic and muscular arteries: a comparison of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2003;26(7):2133–8.
89. Kimoto E, Shoji T, Shinohara K, Inaba M, Okuno Y, Miki T, et al. Preferential stiffening of central over peripheral arteries in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(2):448–52.
90. Ahluwalia N, Drouet L, Ruidavets J-B, Perret B, Amar J, Boccalon H, et al. Metabolic syndrome is associated with markers of subclinical atherosclerosis in a French population-based sample. *Atherosclerosis*. 2006;186(2):345–53.
91. Della-Morte D, Gardener H, Denaro F, Boden-Albala B, Elkind MSV, Paik MC, et al. Metabolic syndrome increases carotid artery stiffness: The Northern Manhattan Study. *Int J Stroke*. 2010;5(3):138–44.
92. Martens FMAC, van der Graaf Y, Dijk JM, Olijhoek JK, Visseren FLJ. Carotid arterial stiffness is marginally higher in the metabolic syndrome and markedly higher in type 2 diabetes mellitus in patients with manifestations of arterial disease. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):646–53.
93. Scuteri A, Najjar SS, Muller DC, Andres R, Hougaku H, Metter EJ, et al. Metabolic syndrome amplifies the age-associated increases in vascular thickness and stiffness. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(8):1388–95.
94. Li CI, Kardina SL, Liu CS, Lin WY, Lin CH, Lee YD, et al. Metabolic syndrome is associated with change in subclinical arterial stiffness: a community-based Taichung community health study. *BMC Public Health*. 2011;11(1):808.
95. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588–605.
96. Bramwell JC and Hill AV. The velocity of the pulse wave in man. *Proc R Soc Lond (Biol)*. 1922;93:298–306.

97. Cavalcante JL, Lima JAC, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic Stiffness. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(14):1511–22.
98. The Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: “establishing normal and reference values”. *Eur Heart J*. 2010;31(19):2338–50.
99. Popele N, Grobbee D, Bots M, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, et al. Association between arterial stiffness and atherosclerosis the Rotterdam study. *Stroke*. 2001;32:454–60.
100. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*. 1999; 99:2434–9.
101. Shah PK. Screening asymptomatic subjects for subclinical atherosclerosis: can we, does it matter, and should we? *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(2):98–105.
102. Wilkinson I, Eniery M and Cockcroft J. Arteriosclerosis and atherosclerosis: guilty by association. *Hypertension*. 2009;54(6):1213–5.
103. Cecelja M and Chowienczyk P. Arterial stiffening: cause and prevention. *Hypertension*. 2010;56:29–30.
104. Hans-Peter Brunner-La Rocca. Towards applicability of measures of arterial stiffness in clinical routine. *Euro Heart J*. 2010;31(19):2320–2.
105. Cecelja M, Chowienczyk P. Dissociation of Aortic Pulse Wave Velocity With Risk Factors for Cardiovascular Disease Other Than Hypertension: A Systematic Review. *Hypertension*. 2009 Nov 2;54(6):1328–36.
106. Cohn JN. Arterial stiffness, vascular disease, and risk of cardiovascular events. *Circulation* 2006;113:601–3.
107. Weber T, Ammer M, Rammer M, Adji A, O'Rourke MF, Wassertheurer S, Rosenkranz S and Eber B. Noninvasive determination of carotid–femoral pulse wave velocity depends critically on assessment of travel distance: a comparison with invasive measurement. *J Hypertens*. 2009;27:1624–30.

108. Ahmed U, Latham PS, Oates PS. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(34):4651–8.
109. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *Jama.* 2004;291(6):711–7.
110. Forouhi NG, Harding AH, Allison M, Sandhu MS, Welch A, Luben R, et al. Elevated serum ferritin levels predict new-onset type 2 diabetes: results from the EPIC-Norfolk prospective study. *Diabetologia.* 2007;50(5):949–56.
111. Michaeli S, öz G, Sorce DJ, Garwood M, Ugurbil K, Majestic S, et al. Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson’s disease using novel MRI contrasts. *Mov Disord.* 2007;22(3):334–40.
112. Iqbal MP, Mehboobali N, Tareen AK, Yakub M, Iqbal SP, Iqbal K, Haider G. Association of body iron status with the risk of premature acute myocardial infarction in a Pakistani population. *PLoS One.* 2013;8(6):e67981.
113. George DK, Goldwurm S, Macdonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology.* 1998;114(2):311–8.
114. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, et al. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(8):2448–55.
115. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol.* 2011;55(4):920–32.
116. Connor JR, Benkovic SA. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann Neurol.* 1992;32:S51-61.
117. Haacke EM, Cheng NYC, House MJ, Liu Q, Neelavalli J, Ogg RJ, et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* 2005;23(1):1–25.

118. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med.* 2012;56:226–33.
119. House MJ, St. Pierre TG, Milward EA, Bruce DG, Olynyk JK. Relationship between brain R_2 and liver and serum iron concentrations in elderly men. *Magn Reson Med.* 2010;63(2):275–81.
120. Joseph AE, Saverymuttu SH, al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD. Comparison of liver histology with ultrasonography in in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol.* 1991;43(1):26–31.
121. Debongnie JC, Pauls C, Fievez M, Wibin E. Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of liver ultrasonography. *Gut.* 1981;22(2):130–5.
122. Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986 Jan 4;292(6512):13–5.
123. Bolster B, Atalar E, Hardy C, McVeigh G. Accuracy of arterial pulse-wave velocity measurement using MR. *J Magn Reson Imaging.* 1998;8(4): 878–88.
124. Boese JM, Bock M, Schoenberg SO, Schad L. Estimation of aortic compliance using magnetic resonance pulse wave velocity measurement. *Phys. Med. Biol.* 2000;45:1703–13.
125. Bradlow WM, Gatehouse PD, Hughes RL, O'Brien AB, Gibbs JSR, Firmin DN, et al. Assessing normal pulse wave velocity in the proximal pulmonary arteries using transit time: a feasibility, repeatability, and observer reproducibility study by cardiovascular magnetic resonance. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25(5):974–81.
126. Peng H-H, Chung H-W, Yu H-Y, Tseng W-YI. Estimation of pulse wave velocity in main pulmonary artery with phase contrast MRI: Preliminary investigation. *J Magn Reson Imaging.* 2006;24(6):1303–10.
127. Dogui A, Kachenoura N, Frouin F, Lefort M, De Cesare A, Mousseaux E, et al. Consistency of aortic distensibility and pulse wave velocity estimates with respect to the Bramwell-Hill theoretical model: a cardiovascular magnetic resonance study. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2011;13:11.

- 128.** Grotenhuis HB, Westenberg JJM, Steendijk P, van der Geest RJ, Ottenkamp J, Bax JJ, et al. Validation and reproducibility of aortic pulse wave velocity as assessed with velocity-encoded MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30(3):521–6.
- 129.** Meer R, Diamant M, Westenberg J, Doornbos J, Bax J, Roos A and Hildo L. Magnetic resonance assessment of aortic pulse wave velocity, aortic distensibility, and cardiac function in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2007;9(4):645–51.
- 130.** Lee J, Shirodaria C, Jackson C, Robson M, Antoniadis C, Francis J, et al. Multi-modal magnetic resonance imaging quantifies atherosclerosis and vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2007;4:44–8.
- 131.** Brandts A, van Elderen SG, Westenberg JJ, van der Grond J, van Buchem MA, Huisman MV, et al. Association of aortic arch pulse wave velocity with left ventricular mass and lacunar brain infarcts in hypertensive patients: assessment with MR imaging. *Radiology*. 2009;253(3):681–8.
- 132.** Joly L, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, Salvi P, Mandry D, Marie P-Y, et al. Pulse wave velocity assessment by external noninvasive devices and phase-contrast magnetic resonance imaging in the obese. *Hypertension*. 2009;54(2):421–6.
- 133.** Roes SD, Alizadeh Dehnavi R, Westenberg JJM, Lamb HJ, Mertens BJA, Tamsma JT, et al. Assessment of aortic pulse wave velocity and cardiac diastolic function in subjects with and without the metabolic syndrome: HDL cholesterol is independently associated with cardiovascular function. *Diabetes Care*. 2008;31(7):1442–4.
- 134.** Wiesmann F, Petersen SE, Leeson PM, Francis JM, Robson MD, Wang Q, et al. Global impairment of brachial, carotid and aortic vascular function in young smokers. *J Am Col. Cardiol*. 2004;44;2056–64.
- 135.** Jonker JT, Tjeerdema N, Hensen LC, Lamb HJ, Romijn JA, Smit JW, et al. Short-term effects of a standardized glucose load on region-specific aortic pulse wave velocity assessed by MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2014;39(3):717–21.

- 136.** Kröner ESJ, Lamb HJ, Siebelink H-MJ, Putter H, Geest RJ, Wall EE, et al. Coupling of vessel wall morphology and function in the aorta and the carotid artery: an evaluation with MRI. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2014;30(1):91–8.
- 137.** Kröner ES, Lamb HJ, Siebelink HM, Cannegieter SC, van den Boogaard PJ, van der Wall EE, et al. Pulse wave velocity and flow in the carotid artery versus the aortic arch: Effects of aging. *J Magn Reson Imaging*. 2014;40(2):287–93.
- 138.** Safar ME, Blacher J, Mourad JJ, London GM. Stiffness of carotid artery wall material and blood pressure in humans: application to antihypertensive therapy and stroke prevention. *Stroke*. 2000;31(3):782–90.
- 139.** Chuang S-Y, Bai C-H, Chen J-R, Yeh W-T, Chen H-J, Chiu H-C, et al. Common carotid end-diastolic velocity and intima-media thickness jointly predict ischemic stroke in Taiwan. *Stroke*. 2011;42(5):1338–44.
- 140.** Yang EY, Chambless L, Sharrett AR, Virani SS, Liu X, Tang Z, et al. Carotid arterial wall characteristics are associated with incident ischemic stroke but not coronary heart disease in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke*. 2011;43(1):103–8.
- 141.** Dixon WT. Simple proton spectroscopic imaging. *Radiology* 1984;153:189–94.
- 142.** Edelman RR, Hahn PF, Buxton R, Wittenberg J, Ferrucci JT, Saini S, Brady TJ. Rapid MR imaging with suspended respiration: clinical application in the liver. *Radiology* 1986;161:125–31.
- 143.** Wong WF, Northrup SR, Herrick RC, Glombicki AP, Wood RP, Morrisett JD. Quantitation of lipid in biological tissue by chemical shift magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 1994;32:440–46.
- 144.** Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 1994; 12:487–95.
- 145.** Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L, et al. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995;5:281–5.

146. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999;276(5):e977–89.
147. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(2):e462–8.
148. Thomas EL, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Doré CJ, Goldin RD, et al. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 2005;54:122–7.
149. van Werven JR, Marsman HA, Nederveen AJ, Smits NJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, Stoker J. Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and point-resolved 1H MR spectroscopy. *Radiology.* 2010;256(1):159–68.
150. Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol.* 2009;51(3):433–45.
151. Kahl S, Straßburger K, Nowotny B, Livingstone R, Klüppelholz B, Keßel K, et al. Comparison of liver fat indices for the diagnosis of hepatic steatosis and insulin resistance. *PLoS One.* 2014;9(4):e94059.
152. Taouli B, Ehman RL, Reeder SB. Advanced MRI Methods for Assessment of Chronic Liver Disease. *Am J Roentgenol.* 2009;193(1):14–27.
153. Kang B-K, Yu ES, Lee SS, Lee Y, Kim N, Sirlin CB, et al. Hepatic fat quantification: a prospective comparison of magnetic resonance spectroscopy and analysis methods for chemical-shift gradient echo magnetic resonance imaging with histologic assessment as the reference standard. *Invest Radiol.* 2012;47(6):368–75.
154. Ma J. Dixon techniques for water and fat imaging. *J Magn Reson Imaging.* 2008;28(3):543–58.

- 155.** Wood JC. Impact of iron assessment by MRI. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:443–50.
- 156.** Carpenter JP, He T, Kirk P, Roughton M, Anderson LJ, de Noronha SV, et al. On T2* magnetic resonance and cardiac iron. *Circulation*. 2011;123(14):1519–28.
- 157.** Aoki S, Okada Y, Nishimura K, Barkovich AJ, Kjos BO, Brasch RC, Norman D. Normal deposition of brain iron in childhood and adolescence: MR imaging at 1.5T. *Radiology*. 1989;172(2):381–5.
- 158.** Langkammer C, Krebs N, Goessler W, Scheurer E, Ebner F, Yen K, et al. Quantitative MR imaging of brain iron: a postmortem validation study. *Radiology*. 2010;257(2):455–62.
- 159.** Gandon Y, Olivie´ D, Guyader D, Aube´ C, Oberti F, Sebillle V, Deugnier Y. Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *Lancet* 2004;363:357–62.
- 160.** Alustiza JM, Artetxe J, Castiella A, Agirre C, Emparanza JI, Otazua P, et al. MR Quantification of hepatic iron concentration. *Radiology*. 2004;230(2):479–84.
- 161.** St. Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood*. 2005;105(2):855–61.
- 162.** de Assis RA, Ribeiro AA, Kay FU, Rosemberg LA, Nomura CH, Loggetto SR, et al. Pancreatic iron stores assessed by magnetic resonance imaging (MRI) in beta thalassemic patients. *Eur J Radiol*. 2012;81(7):1465–70.
- 163.** Williams A, Qian Y, Bear D and Chu CR. Assessing degeneration of human articular cartilage with ultra-short echo time (UTE) T2* mapping. *Osteoarth and Cartil*. 2010;18: 539–46.
- 164.** Sarigianni M, Liakos A, Vlachaki E, Paschos P, Athanasiadou E, Montori VM, et al. Accuracy of magnetic resonance imaging in diagnosis of liver iron overload: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014. doi:10.1016/j.cgh.2014.05.027.

165. Westwood MA, Firmin DN, Gildo M, Renzo G, Stathis G, Markissia K, et al. Intercentre reproducibility of magnetic resonance T2* measurements of myocardial iron in thalassaemia. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2005;21(5):531–8.
166. Anderson LJ, Holden S, Davis B, et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J*. 2001;22(23):2171–9.
167. Bartzokis G, Aravagiri M, Oldendorf WH, Mintz J, Marder SR. Field dependent transverse relaxation rate increase may be a specific measure of tissue iron stores. *Magn Reson Med*. 1993;29:459– 64.
168. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, Coates TD. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005;106(4):1460–5.
169. Guyader D, Gandon Y. Quantification of iron overload. *Bull Acad Natl Med*. 2000;184:337–48.
170. Tziomalos K, Perifanis V. Liver iron content determination by magnetic resonance imaging. *World J Gastroenterol*. 2010;16(13):1587–97.
171. Wood JC. Use of magnetic resonance imaging to monitor iron overload. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(4):747–64.
172. House MJ, St. Pierre TG, Kowdley KV, Montine T, Connor J, Beard J, et al. Correlation of proton transverse relaxation rates (R2) with iron concentrations in postmortem brain tissue from alzheimer’s disease patients. *Magn Reson Med*. 2007;57(1):172–80.
173. McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Normal Vascular Aging: Differential Effects on Wave Reflection and Aortic Pulse Wave Velocity. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(9):1753–60.
174. Urbina E., Srinivasan S, Kieltyka R, Tang R, Bond M, Chen W, et al. Correlates of carotid artery stiffness in young adults: The Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis*. 2004;176(1):157–64.

- 175.** Henry RMA, Ferreira I, Dekker JM, Nijpels G, Scheffer PG, Stehouwer CDA. The metabolic syndrome in elderly individuals is associated with greater muscular, but not elastic arterial stiffness, independent of low-grade inflammation, endothelial dysfunction or insulin resistance—The Hoorn Study. *J Hum Hypertens*. 2009;23(11):718–27.
- 176.** Nemes A, Gavallér H, Csajbók É, Forster T, Csanády M. Obesity is associated with aortic enlargement and increased stiffness: an echocardiographic study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2008;24(2):165–71.
- 177.** Juonala M, Jarvisalo MJ, Mäki-Torkko N, Kähönen M, Viikari JS, Raitakari OT. Risk Factors Identified in Childhood and Decreased Carotid Artery Elasticity in Adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation*. 2005;112(10):1486–93.
- 178.** Montalcini T, Gorgone G, Gazzaruso C, Pujia A. Carotid distension and distensibility impairment in individuals affected by familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):177–80.
- 179.** Morris JK, Bomhoff GL, Gorres BK, Davis VA, Kim J, Lee PP, et al. Insulin resistance impairs nigrostriatal dopamine function. *Exp Neurol*. 2011;231(1):171–80.
- 180.** Lin D, Ding J, Liu JY, He YF, Dai Z, Chen CZ, et al. Decreased serum hepcidin concentration correlates with brain iron deposition in patients with HBV-related cirrhosis. *PLoS One*. 2013;8:e65551.
- 181.** Mark D, Shaw L, Lauer M, O'Malley P, and Heidenreich P. Task Force #5—Is Atherosclerosis Imaging Cost Effective? *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(11):984–89.

Anexo

Artículos y comunicaciones científicas relacionadas con esta tesis

En este capítulo anexo se presenta toda la actividad científica adicional que ha sido realizada en el marco de esta tesis y que constituyen nuevas aportaciones al conocimiento del riesgo cardiometabólico asociado al SMet y sus componentes. En concreto se presentan dos artículos ya publicados, los artículos que están actualmente en revisión editorial, así como las principales contribuciones a congresos nacionales e internacionales

7.1 Otros artículos publicados

Puig J, Blasco G, Daunis-I-Estadella J, Molina X, Xifra G, Ricart W, Pedraza S, Fernández-Aranda F, Fernández-Real JM. **Hypothalamic damage is associated with inflammatory markers and worse cognitive performance in obese subjects.** J Clin Endocrinol Metab. 2014 Nov 25;jc20142682. [Epub ahead of print]. Factor de impacto 6.3.

Hypothalamic damage is associated with inflammatory markers and worse cognitive performance in obese subjects

Josep Puig, MD,^{1,3} Gerard Blasco, BSc,¹ Josep Daunis-i-Estadella, PhD,², Xavier Molina, BSc,¹ Gemma Xifra, MD,³, Wifredo Ricart, MD, PhD,³, Salvador Pedraza, MD,¹ Fernando Fernández-Aranda, PhD⁴, José Manuel Fernández-Real, MD, PhD³

¹Department of Radiology (IDI), Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta. Girona, Spain; ²Department of Computer Science, Applied Mathematics and Statistics, University of Girona. Girona, Spain; ³Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn). Girona, Spain; ⁴Department of Psychiatry, Hospital Universitari de Bellvitge, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn). Barcelona, Spain

Context: Growing evidence implicates hypothalamic inflammation in the pathogenesis of diet-induced obesity and cognitive dysfunction in rodent models. Few studies have addressed the association between obesity and hypothalamic damage in humans and its relevance.

Objective: To determine markers of obesity-associated hypothalamic damage on diffusion tensor imaging (DTI) and to determine whether DTI-metrics are associated with performance on cognitive testing.

Design and Participants: This cross-sectional study analyzed DTI-metrics (primary (λ_1), secondary (λ_2), and tertiary (λ_3) eigenvalues; fractional anisotropy (FA); and mean diffusivity (MD)) in the hypothalamus of 24 consecutive middle-aged obese subjects (13 women; 49.8 ± 8.1 years; body mass index [BMI] 43.9 ± 0.92 Kg/m²) and 20 healthy volunteers (10 women; 48.8 ± 9.5 years; BMI 24.3 ± 0.79 Kg/m²).

Outcome: measures: Hypothalamic damage assessed by DTI-metrics and cognitive performance evaluated by neuropsychological test-battery.

Results: λ_1 values in the hypothalamus were significantly lower in obese subjects ($P < 0.0001$). The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for obesity-associated hypothalamic damage by $\lambda_1 < 1.072$ were 75%, 87.5%, 83.3%, and 80.7%, respectively. Patients with hypothalamic $\lambda_1 < 1.072$ had higher values of BMI, fat mass, inflammatory markers, carotid-intima media thickness, and hepatic steatosis and lower scores on cognitive tests. Combined BMI and alanine aminotransferase had the strongest association with hypothalamic damage reflected by $\lambda_1 < 1.072$ (AUC=0.89).

Conclusions: DTI detects obesity-associated hypothalamic damage associated with inflammatory markers and worse cognitive performance. This study highlights the potential utility of λ_1 as a surrogate marker of obesity-associated hypothalamic damage.

Little is known regarding how brain systems that promote weight stability are altered in obesity (1). Growing evidence implicates immune-cell-mediated tissue inflammation as a mechanism linking obesity to insulin resistance and comorbidities such as cardiovascular disease (2). In animals, high-fat diets lead to increased inflammatory signaling in body-weight-regulating areas of the hypothalamus critical for energy homeostasis, contributing to leptin resistance and weight gain, (3–5) with reactive gliosis in the hypothalamic arcuate nucleus and median eminence (6).

Magnetic resonance imaging (MRI) can help study hypothalamic cytoarchitecture. Lee et al (7) found high-fat diets increased T2 relaxation times in rats' mediobasal hypothalamus, reflecting increased astrogliosis and microglial accumulation. Conventional MRI sequences, such as T2-weighted sequences, show signal changes in brain tissue related to pathophysiological phenomena such as astrogliosis or microglial accumulation.

Diffusion tensor imaging (DTI), an MRI technique that uses information on the predominant direction and degree of water diffusion, reveals microstructural brain-tissue damage after ischemia, infection, or inflammation (8). The degree that diffusion is direction-dependent (anisotropy) depends on the level of tissue organization and integrity and on the degree of freedom of water diffusion along axons, across cell membranes, and in extracellular space. The magnitude of diffusion characteristics can be calculated as eigenvectors/eigenvalues. Three eigenvalues are used to calculate fractional anisotropy (FA), a DTI-metric of the relative difference in water diffusivities along multiple axes: λ_1 (principal axis or axial diffusivity), representing water motion along axons, and λ_2 and λ_3 (shorter perpendicular axes or radial diffusivity), representing diffusion across the axon (8). Gray-matter density and microstructure can be assessed by mean diffusivity (MD) or other DTI-metrics (9). DTI can provide new and more precise information about possible changes in the microstructure of the hypothalamus.

Few studies have evaluated brain-tissue diffusion in obesity. Hypothalamic apparent diffusion coefficients (ADC) are higher in obese than nonobese subjects, (10) suggesting microstructural damage. Body mass index (BMI) correlates with FA in cerebral white matter (11–13). Hypothalamic gray-matter loss correlates with cognitive impairment in multiple sclerosis (MS); (14) however, obesity-associated hypothalamic damage's impact on cognitive function is poorly understood. We assessed obesity-associated hypothalamic damage by DTI and examined its impact on cognitive performance.

Subjects and Methods

Subjects

From January to September 2012, we recruited 24 consecutive obese subjects undergoing MRI in a study evaluating the role of intestinal microflora in nonalcoholic fatty liver disease. We included subjects aged 30 to 65 years with BMI > 30 kg/m² and excluded those with systemic disease, infection in the previous month, serious chronic illness, ethanol intake > 20g per day, or taking medications that might interfere with insulin action. We enrolled 20 healthy subjects (BMI < 25 kg/m²) as controls. Control subjects were normotensive and selected on the basis of similarity in age and sex compared to obese subjects and the absence of a personal history of inflammatory diseases or current drug treatment. The institutional review board (IRB) approved the study, and all subjects provided informed written consent.

Study Protocol

Patients underwent anthropometric measurements, abdominal (15) and vascular (16) ultrasonography, and, after 8 hours fasting, provided blood for measurement of plasma lipids, glucose, and insulin. Glucose and lipid levels were determined by standard laboratory methods. Subjects underwent standard 75 g oral glucose tolerance tests, with determination of glucose and insulin at 0, 30, 60, 90, and 120 minutes. The area under the curve (AUC) for glucose and insulin was then calculated using the trapezoidal method. Serum insulin was measured by radioimmunoassay (RIA). Insulin resistance was determined by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). Serum alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyltransferase (GGT) levels were determined using enzymatic methods. Serum lipopolysaccharide-binding protein (LBP) levels were measured by human-LBP enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (HyCult Biotechnology, Huden, the Netherlands).

Body Composition

Fat mass was determined via dual energy x-ray absorptiometry (GE Lunar iDXA; Milwaukee, WI).

Magnetic resonance imaging

All patients underwent MRI on a 1.5T Intera scanner (Philips Healthcare, Best, the Netherlands). The protocol included axial fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) and DTI sequences. For FLAIR, the parameters were repetition time (TR), 7569msec; echo time (TE), 115msec; inversion delay, 2200msec; flip angle, 90°; matrix, 256 × 192; section thickness, 3 mm; interslice gap, 1 mm; and FOV, 230 × 180 mm. DTI data were acquired using single-shot EPI sequences with the SENSE parallel imaging scheme to reduce scanning time and minimize artifacts. Diffusion-sensitized gradients were applied along 15 noncollinear directions with a b-value of 1000 seconds/mm². Other acquisition parameters were TR/TE, 6795/72ms; FOV, 23 × 23cm; and matrix size, 112 × 112. Forty-five contiguous 3-mm axial sections covering the brain were acquired parallel to the anteroposterior line. DTI scanning took 3 minutes.

Data Processing

DTI images were coregistered; a neuroradiologist blinded to clinical information used dedicated software (Olea Sphere V.2.0, La Ciotat, France) to place free-hand regions of in-

terest (ROIs) in the right and left sides of the hypothalamus using validated landmarks (17). Primary (λ_1), secondary (λ_2), and tertiary (λ_3) eigenvalues, FA, and MD were calculated. DTI measurements were repeated 1 month later to assess intraobserver agreement. Values of DTI-metrics were obtained by averaging all voxels within the ROI (Supplemental Figure 1). Mean values from the each side were averaged for statistical analyses. Mean ROI area was $5 \pm 1.5 \text{ mm}^2$. The hypothalamus was visually inspected for abnormalities on FLAIR.

Neuropsychological assessment

Cognitive performance was assessed with the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) third edition (vocabulary, digit span, picture completion, and picture arrangement subsets). Attention and executive functions were assessed with the Trail Making Test (parts A and B) and modified Wisconsin Card Sorting test. Processing speed and selective attention were assessed with the Stroop Neuropsychological Screening Test. Risk-taking and impulsive behaviors were assessed with the Iowa Gambling Task.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard deviation for continuous variables and as frequencies for categorical variables. To determine differences with respect to the presence of obesity, we used Student's *t* test for quantitative variables and the χ^2 test for qualitative variables. To calculate the λ_1 cutoff to predict hypothalamic damage, we used receiver operator characteristic curves. For each variable, differences according to the prespecified hypothalamic λ_1 cutoff were tested using Student's *t* test or the χ^2 test. Multivariate logistic regression and stepwise regression analyses were used to identify independent predictors of hypothalamic damage. The intraclass correlation coefficient (ICC) was used to classify intraobserver reliability as fair (ICC = 0.5–0.7), good (0.7–0.9), or almost perfect (>0.90). Statistical significance was set at $P < .05$. Statistical analyses were performed with Minitab, Version 16.2.1 (Minitab, State College, PA).

Results

Supplemental Table 1 reports subjects' characteristics. The intraobserver consistency for DTI measurements in the hypothalamus was good (ICC = 0.809). Mean λ_1 hypothalamic values were lower in obese subjects ($P < .001$). The mean hypothalamic λ_1 cutoff that best discriminated obese from control subjects was 1.072 (Figure 1). The sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for hypothalamic damage by mean $\lambda_1 < 1.072$ were 75%, 87.5%, 83.3%, and 80.7%, respectively (AUC:0.854; 95%CI:0.742–0.96). No significant differences were found for λ_2 , λ_3 , FA, or MD. After adjustment for age and sex, subjects with hypothalamic $\lambda_1 < 1.072$ had significantly increased values of BMI, fat mass, ALT, GGT, C-reactive protein (CRP), LBP, carotid intima-media thickness, and prevalence of hepatic steatosis (Table 1). Interestingly, when studying obese and control subjects separately, the hypothalamic λ_1 correlated negatively with fat mass within obese subjects ($r = -0.51$, $P = .01$) but not in nonobese subjects ($r = 0.05$, $P = .8$). We also found significant differences with respect to total fat mass according to a hypothalamic λ_1 cutpoint of 1.072 (Table 1). In a stepwise linear regression analysis, fat mass ($P < .0001$) and HOMA-IR value ($P = .037$), but not age, independently contributed to 22.4% of λ_1 hypothalamic variance. Finally, while fat mass ($P < .0001$) and HOMA-IR ($P = .011$) contributed to 56% of hypothalamic λ_1 variance among women, this was not observed in men.

The BMI cutoff that best discriminated hypothalamic damage was 34 kg/m^2 , yielding 80.7% sensitivity, 83.3% specificity, 87.5% PPV, and 75% NPV (AUC:0.829; $P <$

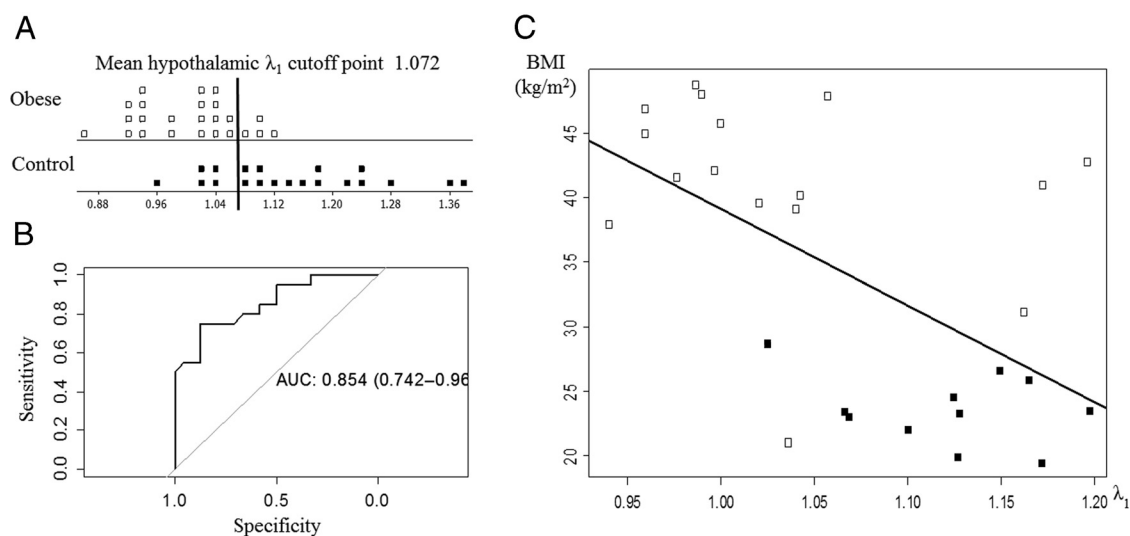


Figure 1. A, Obese subjects had lower hypothalamic primary eigenvalues (λ_1) ($P < .001$). B, To calculate the λ_1 cutoff to predict hypothalamic damage, we used receiver operator characteristic curves. C, Patients with hypothalamic $\lambda_1 < 1.072$ had higher BMI. The equation of the linear regression analysis was BMI = $114.32 - 75.13(\lambda_1)$, $r = 0.58$, $P = .001$.

Table 1. Univariate associations of mean hypothalamic λ_1 DTI-metric and clinical, laboratory, ultrasonographic data and neuropsychological tests in all 44 individuals

	Hypothalamic mean $\lambda_1 < 1.072$ (n = 26)	Hypothalamic mean $\lambda_1 > 1.072$ (n = 18)	p-value
Gender(male/female)	13/13	8/10	0.717
Age(years)	49.385 (8.668)	49.444 (9.018)	0.983
BMI(kg/m ²)	40.385 (9.212)	27.322 (7.687)	<0.001**
Waist circumference(cm)	108.712 (38.198)	91.222 (18.252)	0.050
Fat mass (kg)	42.82 (19.8)	27.52 (13.9)	0.005**
Systolic blood pressure(mmHg)	135.5 (20.506)	128.778 (19.368)	0.276
Diastolic blood pressure(mmHg)	74.923 (12.579)	73.778 (14.132)	0.784
Current smoking(no/former/yes)	12/6/8	9/7/2	0.254
Total cholesterol(mg/dl)	187.462 (42.296)	209 (34.626)	0.071
HDL--cholesterol(mg/dl)	51.231 (14.949)	58.889 (15.733)	0.114
Triglyceride(mg/dl)*	4.442 (0.577)	4.401 (0.479)	0.800
Glucose AUC(mg/dl/min)	17 062.462 (5255.036)	14 964.167 (4223.845)	0.151
Insulin AUC(mU/liter/min)	7650.358 (6131.49)	8791.389 (8591.502)	0.635
HOMA-IR(mean \pm sd)	3.473 (2.747)	2.512 (3.502)	0.337
Aspartate aminotransferase(U/liter)	18.077 (12.977)	7.765 (12.794)	0.015**
Alanine aminotransferase(U/liter)	30.577 (13.822)	18.722 (3.77)	<0.001**
γ -glutamyltransferase(U/liter)	32.077 (23.394)	24.722 (23.649)	0.315
Ultrasensitive CRP(mg/dl)	0.715 (0.859)	0.289 (0.373)	0.031**
LBP(ng/liter)	29.003 (12.417)	20.502 (10.559)	0.019**
Hepatic steatosis(no/yes)	7/19	15/3	0.001**
cIMT(mm)	0.78 (0.165)	0.664 (0.197)	0.049**
WAIS-III vocabulary subtest	38.533 (12.27)	46.182 (4.895)	0.041**
WAIS-III digit span subtest	14.2 (3.59)	16.333 (3.676)	0.143
WAIS-III picture arrangement subtest	34.267 (2.52)	33.583 (3.63)	0.586
WAIS-III picture completion subtest 1	18.533 (8.943)	17.792 (7.344)	0.815
WAIS-III picture completion subtest 2	18.233 (8.664)	18.542 (6.72)	0.918
Trail making test(part A)	49.267 (18.591)	29.909 (11.167)	0.003**
Trail making test(part B)	107.533 (28.2)	107.909 (68.12)	0.987
Stroop Neuropsychological Screening Test	56.2 (8.385)	55.909 (9.268)	0.935
Iowa Gambling Task	47.4 (6.243)	44.818 (8.658)	0.412
Wisconsin Card Sorting Test	54 (5.774)	11.6 (1.265)	0.001**

Abbreviations: AUC, area under curve; BMI, body mass index; cIMT, carotid intima-media thickness; CRP, C-reactive protein; HDL, high density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model of assessment-insulin resistance; LBP, lipopolysaccharide-binding protein; WAIS-III, Wechsler Adult Intelligence Scale-Third Edition. *this variable was log transformed. **Parameters with $P < 0.05$.

.001). The ALT cutoff that best discriminated hypothalamic damage was 23.5 U/l, yielding 69.2% sensitivity,

94.4% specificity, 94.7% PPV, and 68% NPV (AUC: 0.829; $P = .005$). The LBP cutoff that best discriminated hypothalamic damage was 24.1ng/l, yielding 73% sensitivity, 83.3% specificity, 86.3% PPV, and 68.1% NPV (AUC:0.720; $P = .031$)(Supplemental Table 2).

Hypothalamic gray-matter loss defined as $\lambda_1 < 1.072$ significantly correlated with worse cognitive performance (Table 1).

Discussion

Obesity is known to be associated with gray and white matter changes, (10–13) and with hypothalamic inflammation in experimental models (3–5, 7). Obesity is also well known to affect cognitive performance (18, 19). To our knowledge, this would be the first study exploring cognitive function in association with hypothalamic inflammation in obese subjects. In this cross-sectional study, lower mean hypothalamic λ_1 in obese subjects suggests neuronal damage. Interestingly, the strongest predictor of hypothalamic damage in the multivariate analysis was combined BMI and ALT. Fat mass and insulin resistance contributed independently to hypothalamic λ_1 variance. Of note, even within obese subjects, fat mass was significantly associated with hypothalamic λ_1 , and this was especially remarkable among women. Mueller et al had previously reported sex-dependent influences of obesity on cerebral white matter (11). Other factors associated with altered hypothalamic microstructure on DTI were the inflammatory markers CRP, LBP, and carotid intima-media thickness. These findings support the idea that liver and brain damage are interrelated with vascular status in obesity-associated inflammation, contributing to comorbidities such as insulin resistance and cardiovascular disease.

Rapid-onset inflammation and reactive gliosis in the hypothalamus of rodents consuming high-fat diets represents a response to neuronal injury, probably induced by ischemia or excitotoxicity (3–5, 7). Detecting and quantifying obesity-related hypothalamic damage in vivo represents a challenge. Longer hypothalamic T2 relaxation times in mice on high-fat diets probably reflect increased numbers of glial cells, reactive astrocytosis, and/or decreased neuronal populations (7). When visual assessment detected no signal-intensity abnormalities in a study of 34 human subjects, Thaler et al (6) devised a quantitative approach to compare mean signal intensity within ROIs in the mediobasal hypothalamus using ratios with ROIs in adjacent amygdalar tissue to show that obese individuals had higher T2 hyperintensity in the mediobasal hypothalamus suggestive of gliosis.

DTI is promising for in vivo brain-damage assessment.

DTI-metrics express the degree of diffusion anisotropy from obstacles limiting molecular movement in some directions in brain tissue. We found that λ_1 , rather than FA, accurately discriminated obese subjects based on hypothalamic microstructural changes. DTI-metrics probably differ with the stage of disease. As FA is obtained from eigenvalues representing relative differences in water diffusivities along multiple axes, subtle alterations in microarchitecture could be expressed first as a decrease in λ_1 , because the largest eigenvalue will point in the direction of the largest diffusion coefficient; thus, λ_1 could detect early changes in hypothalamic glia better than FA, which would decrease later. Altered DTI-metrics do not prove gliosis, because edema or tumor would yield similar results. However, we excluded subjects with evidence of neurological abnormalities, making these alternative explanations unlikely. Furthermore, as in animal models, the signal suggestive of gliosis correlated positively with BMI but not with age or sex. The association with obesity was strong, lending translational relevance to preclinical studies by suggesting that hypothalamic neuronal injury and associated gliosis are also present in human obesity; therefore, DTI is a promising technique to detect and follow up these endpoints.

Our correlations between hypothalamic structural changes and cognitive tests agree with studies showing worse executive function after hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysfunction (20). The hypothalamus is crucial for emotional regulation and vital functions, but it also has numerous bidirectional connections with other subcortical and cortical areas; (20, 21) moreover, animal and human studies demonstrate projections from the hypothalamus to all prefrontal regions (22). The hypothalamus is also linked to the hippocampus, amygdala, and insular cortex—regions usually associated with cognitive and executive functions (21). This complex system enables close integration of cognitive and emotional information and might explain the hypothalamus's role in cognitive performance.

Our study has limitations, including the relative small sample size. Future studies with larger samples will allow regression analyses to assess associations in greater detail. The hypothalamus' size and location make it susceptible to motion distortion and partial-volume effects. However, the good intraobserver reliability for DTI-measurements and their correlation with cognitive performance suggest DTI detects obesity-induced hypothalamic damage, although this must be confirmed histologically in experimental models. Monitoring hypothalamic changes over time might help define the course and potential reversibility of hypothalamic damage. A longitudinal study, following primary hypothalamic eigenvalues and metabolic

parameters over time in patients at high risk for obesity is required to substantiate these findings. We cannot say whether hypothalamic damage is involved in the pathogenesis of obesity or is simply a marker of obesity or associated conditions like HOMA-IR or obstructive sleep apnea (OSA). We collected no data on years' education, an important predictor of cognitive performance.

In conclusion, our preliminary data indicate that λ_1 could be useful for assessing hypothalamic damage in obese individuals. Given that the hypothalamus plays a pivotal role in the control of food intake and energy expenditure, this approach may offer new perspectives in further studies aimed at detecting obesity-induced hypothalamic damage and in attempts to predict the response to different treatments.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Josep Puig, MD, Department of Radiology (IDI), Hospital of Girona "Dr Josep Trueta" and Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Carretera de França s/n, 17 007, Girona, SPAIN, Phone: +34 972 486 020, Fax: +34 972 483 085, e-mail: jpuigalcantara@idibgi.org; J.M. Fernandez-Real, MD, PhD, Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital of Girona "Dr Josep Trueta" and Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Carretera de França s/n, 17 007, Girona, SPAIN, Phone: +34 972 940 200, Fax: +34 972 940 270, e-mail: jmfreal@idibgi.org.

This work was supported by .

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose

References

1. Myers MG Jr., Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(11):643–651.
2. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011;121:2111–2117.
3. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005;146:4192–4199.
4. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology.* 2010;151:4109–4115.
5. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW, Niswender KD. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E1003–E1012.
6. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012;122:153–162.
7. Lee D, Thaler JP, Berkseth KE, Melhorn SJ, Schwartz MW, Schur EA. Longer T(2) relaxation time is a marker of hypothalamic gliosis in mice with diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304:E1245–1250.
8. Rovaris M, Agosta F, Pagani E, Filippi M. Diffusion tensor MR imaging. *Neuroimaging Clin N Am.* 2009;19:37–43.
9. Kantarci K, Senjem ML, Avula R, Zhang B, Samikoglu AR, Weigand SD, Przybelski SA, Edmonson HA, Vemuri P, Knopman DS, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Petersen RC, Jack CR Jr. Diffusion tensor imaging and cognitive function in older adults with no dementia. *Neurology.* 2011;77:26–34.
10. Alkan A, Sahin I, Keskin L, Cikim AS, Karakas HM, Sigirci A, Erdem G. Diffusion-weighted imaging features of brain in obesity. *Magn Reson Imaging.* 2008;26:446–450.
11. Mueller K, Anwander A, Möller HE, Horstmann A, Lepsien J, Busse F, Mohammadi S, Schroeter ML, Stumvoll M, Villringer A, Pleger B. Sex-dependent influences of obesity on cerebral white matter investigated by diffusion-tensor imaging. *PLoS One.* 2011;6:e18544.
12. Mueller K, Sacher J, Arelin K, Holiga S, Kratzsch J, Villringer A, Schroeter ML. Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Transl Psychiatry.* 2012;2:e200.
13. Marks BL, Katz LM, Styner M, Smith JK. Aerobic fitness and obesity: relationship to cerebral white matter integrity in the brain of active and sedentary older adults. *Br J Sports Med.* 2011;45:1208–1215.
14. Riccitelli G, Rocca MA, Pagani E, Rodegher ME, Rossi P, Falini A, Comi G, Filippi M. Cognitive impairment in multiple sclerosis is associated to different patterns of gray matter atrophy according to clinical phenotype. *Hum Brain Mapp.* 2011;32:1535–1543.
15. Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;189:320–323.
16. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarencu P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS, Zannad F, Zureik M. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis.* 2007;23:75–80.
17. Baroncini M, Jissendi P, Balland E, Besson P, Pruvo JP, Francke JP, Dewailly D, Blond S, Prevot V. MRI atlas of the human hypothalamus. *Neuroimage.* 2012;59:168–180.
18. Marques EL, Halpern A, Corrêa Mancini M, de Melo ME, Horie NC, Buchpiguel CA, Martins Novaes Coutinho A, Ono CR, Prando S, Santo MA, Cunha-Neto E, Fuentes D, Cercato C. Changes in Neuropsychological Tests and Brain Metabolism After Bariatric Surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 [Epub ahead of print] *PubMed.* PMID: 25157409.
19. Fergenbaum JH, Bruce S, Lou W, Hanley AJ, Greenwood C, Young TK. Obesity and lowered cognitive performance in a Canadian First Nations population. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:1957–63.
20. Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.* 2000;886:113–164.
21. Rempel-Clover NL, Barbas H. Topographic organization of connections between the hypothalamus and prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 1998;398:393–419.
22. Plessow F, Schade S, Kirschbaum C, Fischer R. Better not to deal with two tasks at the same time when stressed? Acute psychosocial stress reduces task shielding in dual-task performance. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 2012;12:557–570.

Puig J, Blasco G, Daunis-I-Estadella J, Loshuertos E, Codina J, Cuba V, Ortiz R, Xifra G, Ricart W, Pedraza S, Fernández-Real JM. **Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Age Are Strong Indicators for Atherosclerosis in Obesity.** Clinical Endocrinology. 2014. Factor de impacto 3.3.

ORIGINAL ARTICLE

Nonalcoholic fatty liver disease and age are strong indicators for atherosclerosis in morbid obesity

Josep Puig*, Gerard Blasco*, Josep Daunis-i-Estadella†, Emili Loshuertos‡,§, Jaume Codina*, Víctor Cuba*, Rosa Ortiz¶, Gemma Xifra‡,§, Wifredo Ricart‡,§, Salvador Pedraza*, Massimo Federici** and

1 José Manuel Fernández-Real‡,§

*Department of Radiology (IDI), Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta

†Department of Computer Science, Applied Mathematics and Statistics, University of Girona ‡Department of Diabetes,

Endocrinology and Nutrition, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta

§CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn) ¶Department of Pathology, Hospital Universitari de Girona Dr

2 Josep Trueta, Girona, Spain and **Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

Summary

Objective Whether nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) can predict atherosclerosis in obese patients remains unclear. The aim of our study was to investigate the usefulness of NAFLD and other cardiometabolic parameters in predicting subclinical atherosclerosis in obese patients.

Design, Patients and Measurements We studied 314 consecutive obese subjects (223 women; mean age, 45.04 ± 9.34 years; body mass index 44.3 ± 5 kg/m²) and 47 healthy lean individuals. Hepatic steatosis and atherosclerosis [carotid intima-media thickness (cIMT) >0.8 mm and/or presence of plaques] were evaluated ultrasonographically. Liver biopsies were obtained in 51 patients.

Results In obese patients, mean c-IMT was greater in those with NAFLD ($P < 0.001$). Hepatic steatosis and age were independent predictors of atherosclerosis: the NAFLD-associated OR for atherosclerosis was 5.96 (95%CI, 1.60–22.25; $P = 0.008$) in men and 8.26 (95%CI, 4.02–16.99; $P < 0.001$) in women, and the age-associated OR for atherosclerosis was 1.14 (95%CI, 1.07–1.22; $P < 0.001$) in men and 1.12 (95%CI, 1.08–1.17; $P < 0.001$) in women. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of steatosis for atherosclerosis were 78.70%, 70.50%, 74.00% and 75.60% (AUC = 0.840) in men ≥43.5 years and 86.90%, 52.50%, 68.80% and 76.80% (AUC = 0.761) in women ≥47.5 years, respectively. Agreement between ultrasound-diagnosed steatosis and histology was good

(ICC = 0.79). Combined NAFLD and age was the strongest predictor of atherosclerosis in obesity.

Conclusions Nonalcoholic fatty liver disease and age may be independent risk factors for carotid atherosclerosis in obese individuals. Obese men and women with steatosis aged over 43.5 and 47.5 years, respectively, should be screened for carotid atherosclerosis. However, further evidence is necessary before suggesting an intervention based on current findings.

(Received 20 August 2014; returned for revision 15 September 2014; finally revised 29 November 2014; accepted 7 December 2014)

Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by excessive fat accumulation in hepatocytes, ranging from simple steatosis to steatohepatitis and cirrhosis.¹ The prevalence of NAFLD in the obese is 70–90%.² Although the gold standard for diagnosing NAFLD is liver biopsy, ultrasonography correlates well with histology and is the commonest way of diagnosing hepatic steatosis in clinical practice.³

Epidemiological studies suggest increased cardiovascular mortality in patients with NAFLD.⁴ Carotid intima-media thickness (c-IMT), a validated marker for subclinical atherosclerosis, is strongly associated with cardiovascular risk.⁵ Recently, NAFLD was included among the components of metabolic syndrome; some case-controlled and cross-sectional studies have demonstrated an association between hepatic steatosis and carotid atherosclerosis.^{6–13} Moreover, c-IMT has been related to the histopathological severity of NAFLD, independently of classical risk factors.⁹ NAFLD has been related to atherosclerosis in healthy nonobese men, seemingly due to visceral fat accumulation and insulin resistance.⁷ However, little evidence is known about NAFLD-associated cardiovascular risk in obesity.⁸

Correspondence: Josep Puig, Department of Radiology (IDI), Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Hospital of Girona 'Dr Josep Trueta', Carretera de França s/n, 17007 Girona, Spain. Tel.: +34 972486020;

Fax: +34 972483085; E-mail: jpuigalcantara@idibgi.org

José Manuel Fernández-Real, Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Hospital of Girona 'Dr Josep Trueta', Carretera de França s/n, 17007 Girona, Spain.

Tel.: +34 972940200; Fax: +34 972940270; E-mail: jmreal@idibgi.org

CE: Saravakumar C.	PE: Sharmila
Dispatch: 22.12.14	No. of pages: 7
WILEY	
12698	Manuscript No.
CE N	Journal Code
	

We investigated whether hepatic steatosis and other anthropometric and metabolic parameters could predict subclinical carotid atherosclerosis (cIMT >0.8 mm and/or presence of plaques) in obese individuals without known cardiovascular disease.

Subjects and methods

From January 2010 to February 2012, we consecutively recruited 314 obese subjects from the ongoing multicenter FLORINASH Project, undertaken to evaluate the role of intestinal microflora in adults with NAFLD. Inclusion criteria were age 30–65 years, body mass index (BMI) >30 kg/m² and ability to understand study procedures. Exclusion criteria were history of cardiovascular disease (coronary heart disease, stroke, heart failure, peripheral vascular disease or congenital heart disease), systemic disease, infection in the previous month, serious chronic illness, ethanol intake >20 g/day or use of medications that might interfere with insulin action. We enrolled 47 healthy lean subjects (BMI <25 kg/m²) as controls. The institutional review board approved the study protocol, and consent has been obtained from each subject after full explanation of the purpose and nature of all procedures used.

Study protocol

Patients underwent anthropometric measurements, vascular and abdominal ultrasonography, and, after 8 h fasting, provided blood for measurement of plasma lipids, glucose and insulin. Glucose and lipid levels were determined by standard laboratory methods. Serum insulin was measured in duplicate by monoclonal immunoradiometric assay (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). The intra-assay CV was 5.2% at a concentration of 10 mU/l and 3.4% at 130 mU/l. The interassay CVs were 6.9% and 4.5% at 14 and 89 mU/l, respectively. Insulin resistance was determined by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). Serum alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (GGT) levels were determined using enzymatic methods.

Ultrasound evaluation

We used a Siemens Acuson S2000 (Mochida Siemens Medical System, Tokyo, Japan) ultrasound system with a 3.5 MHz convex transducer to scan the liver and a 7.5 MHz linear array transducer to scan carotid arteries. Images were independently evaluated by two radiologists blinded to clinical and laboratory data.

Hepatic steatosis was graded as absent, mild, moderate or severe according to conventional criteria.¹⁴ Carotid arteries were evaluated according to the Mannheim Consensus.¹⁵ c-IMT values were manually measured in the far wall of each common carotid artery in a proximal segment and in a plaque-free segment 10 mm from the bifurcation. The mean c-IMT value for each subject was calculated from these four measurements. Values >0.80 mm were considered increased.¹⁵ A plaque was defined as a focal thickening ≥1.2 mm in any of 12 carotid segments (near and far walls of the right and left common carotid

arteries, bifurcation and internal carotid artery). Atherosclerosis was considered present when c-IMT >0.8 mm and/or plaques were present.

Liver histology

Liver biopsies were obtained in the 51 patients who underwent bariatric surgery. Liver biopsies were analysed by a single pathologist expert in hepatic pathology. Haematoxylin and eosin, Masson's trichrome and reticulin stains were performed in each liver sample. Histological features of steatosis, lobular inflammation, hepatocellular ballooning and fibrosis were scored using the scoring system for NAFLD.¹⁶ Lobular inflammation was graded 0–3 based on inflammatory foci in a 200× field (0 is none, 1 is <2 foci, 2 is 2–4 foci, and 3 is >4 foci). Liver disease (specifically tumoural disease and HCV infection) and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up.

Framingham risk scores calculation

The Framingham risk scores (FRS) is calculated using a standard score sheet that is gender specific and includes the following variables: age, blood pressure, total cholesterol, HDL cholesterol, smoking history and history of diabetes.¹⁷ The FRS sheets were used for estimating the 10-year probability of developing CHD in our patients with NAFLD. Thus, this comparative average 10-year CHD risk refers to the risk estimate derived from the experience of the Framingham Heart Study population.¹⁷

Current smoking status was defined as any self-reported smoking. Hypertension was defined as mean resting blood pressure ≥130/85 mmHg, over two measurements or use of antihypertensive medications at the onset of NAFLD diagnosis. Fasting blood levels of glucose, triglycerides, total cholesterol and HDL cholesterol were measured in a standardized laboratory.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± standard deviations for continuous variables and as frequencies for categorical variables. The skewness and kurtosis of the distributions required logarithmic transformation for statistical analysis of plasma triglycerides, HOMA-IR and C-reactive protein. We used Student's *t*-test to determine differences in quantitative variables, and the chi-square test to determine differences in qualitative variables related to the presence of atherosclerosis. To examine possible sex differences in the associations between NAFLD and carotid atherosclerosis, we also analysed men and women separately. Multivariate logistic regression was used to identify independent predictors of atherosclerosis. To calculate the age cut-offs to predict atherosclerosis, we used receiver operator characteristic curves. Intraclass correlation coefficients (ICC) were used to determine the degree of agreement between observers on the assessment of steatosis and carotid plaques and between the grade of steatosis by ultrasound and histology; agreement was classified as fair (ICC = 0.5–0.7), good (0.7–0.9) or almost perfect (>0.90). Pearson correlation was used to determine agreement on c-IMT. Statistical significance was set

Table 1. Univariate associations of NAFLD with clinical, laboratory and ultrasonographic data stratified by sex

	Men				Women			
	Hepatic steatosis		P-value	Control (n = 15)	Hepatic steatosis		P-value	Control (n = 32)
	Absent (n = 21)	Present (n = 77)			Absent (n = 102)	Present (n = 117)		
Age (years)	40.33 ± 9.83	44.56 ± 8.94	0.086	44.05 ± 11.61	43.27 ± 9.15	47.71 ± 9.01	39.21 ± 11.17	
Menopause (%) (no/yes)	—	—	—	—	74.6/25.4	49.3/50.7	80.5/19.5	
Body mass index (kg/m ²)	44.26 ± 5.11	44.49 ± 5.44	0.857	25.37 ± 2.93	43.64 ± 5.72	45.44 ± 5.88	22.72 ± 2.35	
Waist circumference (cm)	121.8 ± 26.5	134.7 ± 11.8	0.047	89.45 ± 9.85	120.1 ± 14.2	124.1 ± 17.5	76.1 ± 6.8	
Systolic blood pressure (mmHg)	142.8 ± 16.5	141.6 ± 19.7	0.781	127.7 ± 15	133.4 ± 17.6	144.4 ± 20.6	119.9 ± 13.3	
Diastolic blood pressure (mmHg)	78.4 ± 10.9	82.7 ± 12.7	0.130	72.5 ± 8	74.4 ± 11.4	78.0 ± 11.3	66.4 ± 8.9	
Current smoking (no/yes)	9/12	34/43	0.969	7/9	45/62	52/70	10/24	
Total cholesterol (mg/dl)	186.2 ± 32.4	191.4 ± 33.2	0.524	202.6 ± 35.2	194.6 ± 38.5	199.0 ± 34.6	198.1 ± 45.6	
HDL cholesterol (mg/dl)	43 ± 8.57	40.26 ± 6.82	0.187	56.11 ± 11.71	49.2 ± 11.4	48.1 ± 11.7	72.85 ± 16.76	
HDL/Total cholesterol ratio	0.234 ± 0.048	0.2182 ± 0.0635	0.205	0.278 ± 0.057	0.260 ± 0.072	0.246 ± 0.065	0.380 ± 0.091	
Triglyceride (mg/dl)*	4.71 ± 0.40	4.89 ± 0.45	0.075	4.34 ± 0.40	4.64 ± 0.45	4.79 ± 0.40	4.18 ± 0.41	
Fasting glucose (mg/dl)	89.7 ± 9.6	97.8 ± 25.5	0.028	90 ± 7.39	89.9 ± 13.2	101.9 ± 23.1	83.21 ± 8.09	
Glucose AUC (mg/dl/min)	16849 ± 3022	18581 ± 4036	0.043	14924 ± 2784	15812 ± 3149	18672 ± 4220	12813 ± 2372	
Fasting insulin (mU/l)	16 ± 8.88	22.7 ± 23.4	0.052	4.82 ± 4.39	12.3 ± 12.8	15.47 ± 8.72	3.37 ± 3.15	
Insulin AUC (mU/l/min)	10374 ± 6694	13081 ± 8274	0.142	4792 ± 3414	7875 ± 5123	8571 ± 5045	4079 ± 2833	
HOMA-IR (mean ± SD)	3.60 ± 1.93	5.52 ± 5.80	0.020	1.203 ± 1.140	2.80 ± 3.29	3.95 ± 2.68	0.74 ± 0.65	
Aspartate aminotransferase (U/l)	30.5 ± 12.9	29.7 ± 12.1	0.839	28.8 ± 8.7	19.1 ± 4.87	25.4 ± 11.8	25 ± 3.4	
Alanine aminotransferase (U/l)	29.6 ± 21.3	41.8 ± 24.8	0.031	21.2 ± 7.1	19.5 ± 8.8	28.2 ± 16.2	17.29 ± 5.84	
Gamma-glutamyltransferase (U/l)	31.4 ± 18.8	36.5 ± 21.1	0.292	31.4 ± 37.1	23.9 ± 26.2	35.4 ± 33.5	17.6 ± 8.7	
Ultrasensitive CRP (mg/dl)	0.590 ± 0.383	0.875 ± 0.712	0.018	0.146 ± 0.150	0.947 ± 0.808	1.090 ± 0.847	0.221 ± 0.298	
cIMT (mm)	0.591 ± 0.119	0.757 ± 0.156	<0.001	0.579 ± 0.095	0.565 ± 0.107	0.720 ± 0.150	0.463 ± 0.127	
Increased cIMT (>0.8 mm) (no/yes)	18/3	44/33	0.017	19/0	103/4	81/41	33/1	
Carotid plaque (no/yes)	18/3	60/17	0.305	19/0	99/8	83/39	32/2	
Atherosclerosis (no/yes)	18/3	37/40	0.004	13/6	96/11	62/60	33/1	
Framingham risk score	7.85 ± 5.33	10.6 ± 5.32	0.008	7.68 ± 5.83	9.42 ± 7.06	13.28 ± 6.12	5.48 ± 6.98	
Calculated 10-year coronary heart disease risk (%)	7.06 ± 6.35	12.11 ± 8.16	0.001	7.53 ± 6.03	2.47 ± 4.03	4.63 ± 5.80	0.88 ± 1.04	

AUC, area under curve; cIMT, carotid intima-media thickness; CRP, C-reactive protein; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model of assessment-insulin resistance; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease.

*This variable was log transformed.

Table 2. Univariate associations of atherosclerosis with clinical, laboratory and ultrasonographic data stratified by sex

	Men				Women			
	Carotid atherosclerosis (cIMT >0.8 mm and/or plaques)		P-value		Carotid atherosclerosis (cIMT >0.8 mm and/or plaques)		P-value	
	Absent (n = 50)	Present (n = 41)	Control (n = 15)	P-value	Absent (n = 154)	Present (n = 69)	P-value	
Age (years)	39.22 ± 8.26	48.49 ± 8.13	44.05 ± 11.61	<0.001	42.97 ± 9.00	51.32 ± 7.15	<0.001	
Menopause (%) (no/yes)					92.9/7.1	38.5/61.5	<0.001	
Body mass index (kg/m ²)	44.54 ± 5.12	44.26 ± 5.66	25.37 ± 2.93	0.803	44.60 ± 5.79	44.50 ± 5.93	0.912	
Waist circumference (cm)	129.9 ± 21.1	134.15 ± 9.81	89.45 ± 9.85	0.212	120.8 ± 14	124.9 ± 20	0.137	
Systolic blood pressure (mmHg)	140.7 ± 16.4	143.5 ± 22.8	127.7 ± 15	0.512	135.5 ± 18.5	146.8 ± 21.5	<0.001	
Diastolic blood pressure (mmHg)	80.0 ± 10.5	85.0 ± 14.3	72.53 ± 8.08	0.070	74.6 ± 11.4	79.2 ± 10.2	0.004	
Current smoking (no/yes)	23/27	20/21	14/5	0.400	62/92	25/44	0.128	
Total cholesterol (mg/dl)	183.4 ± 32.2	196.9 ± 31.7	202.6 ± 35.2	0.053	195.1 ± 37.6	201.7 ± 34.8	0.204	
HDL cholesterol (mg/dl)	40.44 ± 7.92	40.88 ± 6.54	56.11 ± 11.71	0.773	48.7 ± 11.6	47.8 ± 11.2	0.552	
HDL/Total cholesterol ratio	0.227 ± 0.065	0.213 ± 0.054	0.278 ± 0.057	0.267	0.255 ± 0.065	0.243 ± 0.076	0.278	
Triglyceride (mg/dl)*	4.79 ± 0.45	4.95 ± 0.45	4.34 ± 0.40	0.104	4.68 ± 0.43	4.81 ± 0.43	0.050	
Fasting glucose (mg/dl)	96.1 ± 29.5	94.2 ± 11.3	90 ± 7.39	0.690	92.9 ± 16.6	104.2 ± 24.9	0.001	
Glucose AUC (mg/dl/min)	17183 ± 3523	18723 ± 3462	14924 ± 2784	0.051	16359 ± 3456	19141 ± 4246	<0.001	
Fasting insulin (mmol/l)	123.9 ± 29.7	136.1 ± 33.4	101 ± 22.21	0.085	123.4 ± 36.8	155.3 ± 54.4	<0.001	
Insulin AUC (mU/l/min)	13576 ± 8676	11381 ± 7231	4792 ± 3414	0.221	8066 ± 4916	8716 ± 5590	0.449	
HOMA-IR (mean ± SD)	4.66 ± 3.48	5.48 ± 6.98	1.20 ± 1.14	0.513	3.09 ± 3.01	4.18 ± 3.11	0.029	
Aspartate aminotransferase (U/l)	29.6 ± 11.1	28.7 ± 12.6	28.80 ± 8.70	0.769	20.71 ± 6.46	26.8 ± 14.2	0.010	
Alanine aminotransferase (U/l)	36.9 ± 21.2	38.6 ± 24.6	21.21 ± 7.18	0.736	22.1 ± 10.4	29.2 ± 19.3	0.006	
Gamma-glutamyltransferase (U/l)	35.9 ± 16.9	34.7 ± 24.0	31.47 ± 37.18	0.796	27.6 ± 28.8	36.3 ± 35.5	0.076	
Ultrasensitive CRP (mg/dl)	0.80 ± 0.67	0.82 ± 0.70	0.14 ± 0.14	0.901	1.00 ± 0.78	1.07 ± 0.92	0.572	
cIMT (mm)	0.618 ± 0.097	0.847 ± 0.128	0.563 ± 0.148	<0.001	0.578 ± 0.095	0.797 ± 0.148	<0.001	
Increased cIMT (>0.8 mm) (no/yes)	50/0	7/34	17/2	<0.001	154/0	27/42	<0.001	
Carotid plaque (no/yes)	50/0	24/17	13/6	<0.001	154/0	24/45	<0.001	
Hepatic steatosis (no/yes)	16/34	3/38	16/3	<0.001	94/60	11/58	<0.001	
Without (%)	16 (16)	3 (7.3)	16 (84.2)		94 (61)	11 (15.8)	32 (94.1)	
Slight (%)	11 (22)	7 (17.1)	0		43 (28)	19 (27.5)	0	
Moderate (%)	13 (26)	19 (46.2)	3 (15.8)		16 (10.4)	25 (36.1)	2 (5.9)	
Severe (%)	10 (20)	12 (29.3)	0		1 (0.6)	14 (20.1)	0	
Framingham risk score	7.40 ± 5.76	12.55 ± 3.32	7.68 ± 5.83	<0.001	9.80 ± 7.15	14.97 ± 4.75	<0.001	
Calculated 10-year coronary heart disease risk (%)	7.21 ± 6.36	13.96 ± 7.97	7.53 ± 6.03	<0.001	2.84 ± 4.37	5.30 ± 6.23	<0.001	

AUC, area under curve; cIMT, carotid intima-media thickness; CRP, C-reactive protein; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model of assessment-insulin resistance; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease.

*This variable was log transformed.

at $P < 0.05$. Statistical analyses were performed with MINITAB, Version 16.2.1 (Minitab, State College, PA, USA).

Results

The prevalence of NAFLD in the obese individuals ($n = 314$; 223 women; mean age, 45.04 ± 9.34 years) was 63.4% (Table 1). Carotid atherosclerosis was detected in 110 (35%) (45% of the men, 30.8% of the women) (Table 2). After adjustment for confounding factors (blood pressure, triglycerides, total cholesterol, fasting glucose and fasting insulin), subjects with NAFLD had a greater mean c-IMT (0.757 ± 0.156 mm for men; 0.720 ± 0.150 mm for women) than those without (0.591 ± 0.119 mm for men; 0.579 ± 0.095 mm for women) ($P < 0.001$) (Table 1). Among men, NAFLD and age were the only variables that differentiated whether atherosclerosis was present ($P < 0.001$). Women with atherosclerosis also had

higher systolic and diastolic blood pressure, fasting glucose, 2-h glucose during oral glucose tolerance test, fasting insulin, HOMA-IR, aspartate aminotransferase and ALT. The prevalence of steatosis in patients with atherosclerosis was 92.7% in men and 84.1% in women.

Multivariate analysis revealed ultrasound-detected steatosis and age were independent predictors of carotid atherosclerosis (Table 3). The NAFLD-associated OR for atherosclerosis was 5.96 (95% CI, 1.60–22.25; $P = 0.008$) in men and 8.26 (95% CI, 4.02–16.99; $P < 0.001$) in women. The age-associated OR for atherosclerosis was 1.14 (95% CI, 1.07–1.22; $P < 0.001$) in men and 1.12 (95% CI, 1.08–1.17; $P < 0.001$) in women.

The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of steatosis for atherosclerosis were 86.90%, 52.50%, 68.80% and 76.80% (AUC 0.761), respectively, in women ≥ 47.5 years and 78.70%, 70.50%, 74.00% and 75.60% (AUC 0.84), respectively, in men ≥ 43.5 years (Fig. 1).

Table 3. Multiple logistic regression analysis: predictors of atherosclerosis (cIMT >0.8 mm and/or presence of plaques) among 314 obese individuals **4**

Univariate Analysis								
Independent variable	Men ($n = 91$)				Women ($n = 223$)			
	β -coefficient	Odds ratio (95% CI)	P -value	Area under the curve	β -coefficient	Odds ratio (95% CI)	P -value	Area under the curve
Hepatic steatosis	1.785	5.96 (1.60–22.25)	0.008	0.62	2.112	8.26 (4.02–16.99)	<0.001	0.73
Age (years)	0.134	1.14 (1.07–1.22)	<0.001	0.79	0.117	1.12 (1.08–1.17)	<0.001	0.76
Triglyceride (mg/dl)*	0.788	2.20 (0.85–5.71)	0.105	0.58	0.657	1.93 (1.00–3.74)	0.052	0.59
Alanine aminotransferase (U/l)	0.003	1.00 (0.99–1.02)	0.729	0.52	0.035	1.04 (1.01–1.06)	0.002	0.62
Multivariate analysis								
Model	β -coefficient	Odds ratio (95% CI)	P -value	Area under the curve				
Men ($n = 91$)	1.857	6.41 (1.37–29.96)	0.018	0.81				
Hepatic steatosis and age	0.134	1.14 (1.07–1.22)	0.000					
Women ($n = 223$)	2.003	7.41 (3.43–16.02)	0.000	0.84				
Hepatic steatosis and age	0.111	1.12 (1.07–1.17)	0.000					
Hepatic steatosis and triglyceride (mg/dl)*	2.048	7.75 (3.75–16.03)	0.000	0.75				
Hepatic steatosis and ALT (U/l)	0.407	1.50 (0.71–3.17)	0.285					
Hepatic steatosis and ALT (U/l)	2.054	7.80 (3.63–16.77)	0.000	0.74				
Age and triglyceride (mg/dl)*	0.016	1.02 (0.99–1.04)	0.148					
Age and triglyceride (mg/dl)*	0.118	1.13 (1.08–1.17)	0.000	0.77				
Age and ALT (U/l)	0.688	1.99 (0.96–4.11)	0.063					
Age and ALT (U/l)	0.121	1.13 (1.08–1.18)	0.000	0.78				
Triglyceride (mmol/l)* and ALT (U/l)	0.034	1.03 (1.01–1.06)	0.007					
Triglyceride (mmol/l)* and ALT (U/l)	0.554	1.74 (0.89–3.42)	0.108	0.63				
Hepatic steatosis, age, and triglyceride (mg/dl)*	0.033	1.03 (1.01–1.06)	0.004					
Hepatic steatosis, age, and triglyceride (mg/dl)*	1.923	6.84 (3.13–14.97)	0.000	0.84				
Hepatic steatosis, age, and ALT (U/l)	0.111	1.12 (1.07–1.17)	0.000					
Hepatic steatosis, age, and ALT (U/l)	0.309	1.36 (0.60–3.10)	0.462					
Hepatic steatosis, age, and ALT (U/l)	1.970	7.17 (3.14–16.38)	0.000	0.84				
Hepatic steatosis, age, and ALT (U/l)	0.119	1.13 (1.08–1.18)	0.000					
Hepatic steatosis, age, and ALT (U/l)	0.017	1.02 (0.99–1.04)	0.209					

ALT, alanine aminotransferase; cIMT, carotid intima-media thickness.

*Triglyceride variable was log transformed.

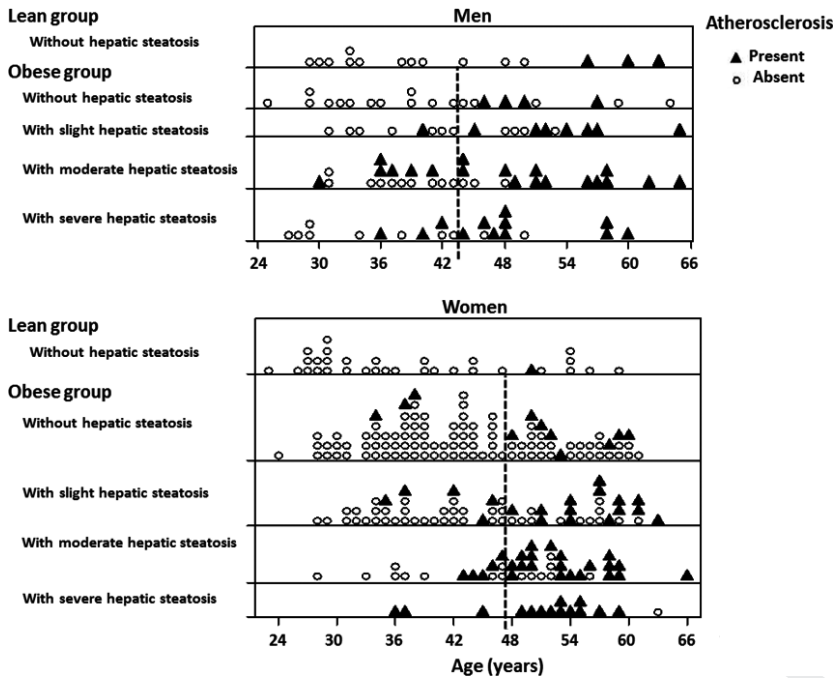


Fig. 1 Distribution of carotid atherosclerosis according to sex, hepatic steatosis and age. The age cut-off values are represented with dashed lines (men, 43.5; women, 47.5).

The interobserver agreement was almost perfect for steatosis (ICC = 0.97), good for assessment of carotid plaques (ICC = 0.82) and good for steatosis identification between ultrasound and histology (ICC = 0.79). Pearson's correlation for c-IMT was 0.75.

Discussion

We evaluated the predictive value of hepatic steatosis among other anthropometric and metabolic parameters for cardiovascular risk defined as carotid atherosclerosis reflected in c-IMT and plaques on ultrasound in obese adults. Combined NAFLD and age was the best predictor of atherosclerosis, more useful than other combinations of parameters (NAFLD, age, BMI, blood pressure, glucose, lipids, HOMA-IR and liver enzymes). Our findings add to those reported by Fracanzani *et al.*,¹² who demonstrated that steatosis and age were independent risk factors of vascular damage in nonobese patients with NAFLD, with odds ratios of 6.9 and 6, respectively. Similarly, in our cohort, NAFLD increased the frequency of atherosclerosis 5.96-fold in men and 8.26-fold in women. Recent studies show that patients with ultrasound-diagnosed NAFLD have greater c-IMT and prevalence of carotid plaques than controls.^{6–13} Although the exact role of NAFLD in the pathogenesis of atherosclerosis is unclear, endothelial dysfunction, oxidative stress, subclinical inflammation, abnormal lipid and glucose metabolisms, and other metabolic abnormalities are probably involved.¹ Increased c-IMT in obese middle-aged women without known cardiovascular disease has been reported.^{18,19} In obesity, other factors that could affect c-IMT include type 2 diabetes, insulin resistance and secreted proinflammatory factors like free fatty acids, adiponectin, tumour necrosis factor- α or other adipocytokines.²⁰ A recent study in a healthy multi-ethnic cohort found that the

association between steatosis and carotid atherosclerosis did not remain significant after adjustment for either BMI or waist circumference, indicating that rather than an independent risk marker for atherosclerosis, steatosis may derive from excess adiposity.⁸ Excess body fat may result in steatosis because excess adipose tissue becomes the primary source of fatty acids that deposit in the liver, being responsible for approximately 60% of triglyceride accumulation.²¹

As epidemiological studies suggest increased cardiovascular mortality in patients with NAFLD, detecting early vascular damage is important.¹³ Our finding that steatosis was the variable with the strongest independent association with atherosclerosis, indirectly supports previous studies suggesting that hepatic fat accumulation itself could be atherogenic.^{7,12} The histopathologic severity of NAFLD is closely associated with increased c-IMT, independent of classical risk factors, insulin resistance and metabolic syndrome.²⁰ Our study provides a clinically useful cut-off age for predicting atherosclerosis when ultrasound detects steatosis: 43.5 years for men and 47.5 years for women, which are close to the mean age in our sample.

Some limitations of our study merit comment. As the subjects were recruited from a study with a different primary outcome objective, there would be chances of this being influenced by a significant selection bias. NAFLD was diagnosed by ultrasound, not by histology. Although ultrasound is operator dependent and usually detects steatosis only when more than 30% of hepatocytes are compromised by fat,³ we found good agreement (ICC = 0.79) between ultrasound and biopsy for grading steatosis. A larger sample might enable other robust indicators of atherosclerosis in obese adults to be identified. The number of men being studied appears to be disproportionately small to arrive at a definite conclusion. Our cross-sectional design cannot determine causality; only a longitudinal approach could determine

the real effects of steatosis and age on carotid atherosclerosis. Although c-IMT has been well established as a surrogate of atherosclerosis and has been associated with both prevalent and incident cardiovascular disease,^{22,23} c-IMT and cardiovascular risk is clearly not the same. No evidence has been put forth to suggest that an intervention will substantially alter the course of the disease. Finally, the age range of the study subjects was relatively high. Therefore, the influence of disease related variables like obesity would be very different depending on the duration of disease exposure.

In conclusion, we found nonalcoholic fatty liver disease and age are strong independent predictors of atherosclerosis in obese adults. Therefore, we recommend routine carotid evaluation to identify early atherosclerotic changes in obese adults with ultrasound-diagnosed nonalcoholic fatty liver disease, especially in men older than 43.5 years and in women older than 47.5 years.

5 Acknowledgement

This work was supported by European Project FLORINASH – FP7-HEALTH-2009-2.4.5-1.

References

- Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1221–1231.
- Marchesini, G., Moscatiello, S., Di Domizio, S. *et al.* (2008) Obesity-associated liver disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, S74–S80.
- Bohte, A.E., van Werven, J.R., Bipat, S. *et al.* (2001) The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and ¹H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *European Radiology*, **21**, 87–97.
- Jepsen, P., Vilstrup, H., Mellemejaer, L. *et al.* (2003) Prognosis of patients with a diagnosis of fatty liver: a registry-based cohort study. *Hepato-Gastroenterology*, **50**, 2101–2104.
- de Groot, E., Hovingh, G.K., Wiegman, A. *et al.* (2004) Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation*, **109**, III33–III38.
- Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R. *et al.* (2004) Relation of nonalcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men: role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care*, **27**, 2498–2500.
- Brea, A., Mosquera, D., Martín, E. *et al.* (2005) Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **25**, 1045–1050.
- Dick, T.J., Lesser, I.A., Leipsic, J.A. *et al.* (2013) The effect of obesity on the association between liver fat and carotid atherosclerosis in a multi-ethnic cohort. *Atherosclerosis*, **226**, 208–213.
- Volzke, H., Robinson, D.M., Kleine, V. *et al.* (2005) Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *The World Journal of Gastroenterology*, **11**, 1848–1853.
- Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R. *et al.* (2006) Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*, **29**, 1325–1330.
- Kim, H.C., Kim, D.J. & Huh, K.B. (2009) Association between nonalcoholic fatty liver disease and carotid intima-media thickness according to the presence of metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, **204**, 521–525.
- Fracanzani, A.L., Burdick, L., Raselli, S. *et al.* (2008) Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Medicine*, **121**, 72–78.
- Sookoian, S. & Pirola, C.J. (2008) Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *Journal of Hepatology*, **49**, 600–607.
- Strauss, S., Gavish, E., Gottlieb, P. *et al.* (2007) Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *American Journal of Roentgenology*, **189**, 320–323.
- Touboul, P.J., Hennerici, M.G., Meairs, S. *et al.* (2007) Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovascular Diseases*, **23**: 75–80.
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M. *et al.* (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, **41**, 1313–1321.
- Wilson, P.W., D’Agostino, R.B., Levy, D. *et al.* (1998) Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, **97**, 1837–1847.
- De Michele, M., Panico, S., Iannuzzi, A. *et al.* (2002) Association of obesity and central fat distribution with carotid artery wall thickening in middle-aged women. *Stroke*, **33**, 2923–2928.
- Lo, J., Dolan, S.E., Kanter, J.R. *et al.* (2006) Effects of obesity, body composition, and adiponectin on carotid intima-media thickness in healthy women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 1677–1682.
- Kotsis, V.T., Stabouli, S.V., Papamichael, C.M. *et al.* (2006) Impact of obesity in intima media thickness of carotid arteries. *Obesity (Silver Spring)*, **14**, 1708–1715.
- Loria, P., Lonardo, A. & Targher, G. (2008) Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis. *Clinical Science (London)*, **115**, 1–12.
- Chambless, L.E., Heiss, G., Folsom, A.R. *et al.* (1997) Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993. *American Journal of Epidemiology*, **146**, 483–494.
- O’Leary, D.H., Polak, J.F., Kronmal, R.A. *et al.* (1999) Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *New England Journal of Medicine*, **340**, 14–22.

7.2 Artículos en revisión editorial

A continuación se citan los artículos que en fecha de 10 de diciembre de 2014 están en fase de revisión editorial:

- Puig J, Blasco G, Daunis-I-Estadella J, Moreno M, Ametller G, Molina X, Xifra G, Ricart W, Pedraza S, Fernández-Aranda F, Fernández-Real JM. **Lower serum osteocalcin concentrations are associated with brain microstructural changes on magnetic resonance imaging and worse cognitive performance.** En revision en International Journal of Obesity. Factor de impacto 5.3.
- Fernández-Real JM, Serino M, Blasco G, Puig J, Daunis-i-Estadella J, Ricart W, Burcelin R, Portero-Otin M. **Gut microbiota interacts with brain microstructure and function.** En revision en Scientific Reports. Factor de impacto 5.

7.3 Contribuciones a Congresos

Adicionalmente, de este trabajo de tesis se derivan las siguientes aportaciones en congresos nacionales e internacionales:

- Blasco G, Puig J, Daunis-i-Estadella J, Molina X, Xifra G, Pedraza S , Ricart W, Fernández-Real JM. **Brain Iron Overload Correlates with Metabolic Homeostasis and Cognitive Dysfunction in Obese Subjects.** *74th Scientific Sessions of the American Diabetes Association.* San Francisco 2014. Poster científico.
- Blasco G, Puig J, Molina X, Daunis-i-Estadella J, Fernández-Real JM y Pedraza S. **La Obesidad y la Esteatosis se asocian a la Concentración de Hierro Hepático en Individuos con Obesidad.** XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). Oviedo 2014. Comunicación oral.

- Blasco G, Puig J, Molina X, Daunis-i-Estadella J, Fernández-Real JM y Pedraza S. **La Obesidad y el Depósito de Hierro Cerebral se asocian al Deterioro Cognitivo Precoz.** XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). Oviedo 2014. Comunicación oral.

- Blasco G, Puig J, Molina X, Daunis-i-Estadella J, Fernández-Real JM y Pedraza S. **Asociación entre la Aterosclerosis Subclínica y la Estructura Cerebral en Individuos con Obesidad: Análisis de Tensor de Difusión por Resonancia Magnética.** XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). Oviedo 2014. Comunicación oral.

- Blasco G, Puig J, Molina X, Daunis-i-Estadella J, Fernández-Real JM y Pedraza S. **Asociación entre el Depósito de Hierro Hepático y Cerebral en Sujetos con Obesidad.** XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). Oviedo 2014. Comunicación oral.

- Blasco G. **Metabolismo de la Obesidad por Imagen de Resonancia Magnética.** IV Congreso Nacional de Técnicos Superiores en Imagen para el Diagnóstico. Barcelona 2014. Ponencia invitada.

- Blasco G, Puig J, Molina X, Daunis-i-Estadella J, Ricart W, Pedraza S. **Estudio de la velocidad de la onda del pulso en arteria carótida común mediante resonancia magnética: estudio preliminar.** XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). Granada 2012. Comunicación oral.

