



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE  
LA SALUD

**“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL SISTEMA RENINA-  
ANGIOTENSINA EN PACIENTES JÓVENES MEXICANOS CON  
ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL.”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

**MARIA ANTONIETA DE JESUS ARAUJO SOLÍS**

DIRECTORA DE TESIS

**Dra. Irma Isordia Salas**

H.G.Z. 1 Carlos Mc Gregor Sánchez Navarro, Instituto Mexicano del Seguro Social

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María del Carmen Martínez García

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Dr. Carlos Gerardo Cantú Brito.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. S.S.A.

Dra. Irma Isordia Salas.

HGZ1 Carlos Mc Gregor Sánchez Navarro. I.M.S.S.

Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz.

HGZ1 Carlos Mc Gregor Sánchez Navarro. I.M.S.S.

Dr. Sergio Iván Valdés Ferrer

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. S.S.A.

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Esta investigación recibió financiamiento de: El Fondo de Investigación en Salud IMSS (FIS/IMSS/PROT/G13/1195); (FIS/IMSS/PROT/PRIO/13/023), CONACyT Consolidación de Grupos de Investigación modalidad repatriación (No. 050232), Apoyo Complementario para Investigadores Nivel 1 No. (118254), y Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS-IMSS- /ISSSTE/CONACYT. No. 261887.

## ÍNDICE.

	Página.
RESUMEN .....	4
I. MARCO TEÓRICO.....	6
II. JUSTIFICACIÓN.....	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
IV. HIPÓTESIS.....	26
V. OBJETIVO .....	26
VI. PACIENTES MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
1. Diseño de Estudio .....	27
2. Universo de Trabajo .....	27
3. Selección de la Muestra .....	27
4. Tamaño de la Muestra .....	29
5. Descripción de las Variables .....	29
6. Descripción General del Estudio .....	33
7. Análisis Estadístico .....	36
VII. ASPECTOS ETICOS .....	38
VIII. RESULTADOS.....	40
IX. DISCUSIÓN.....	46
X. BIBLIOGRAFIA.....	52

## RESUMEN

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un mecanismo de señalización hormonal implicado en la regulación de la presión arterial y la aterosclerosis.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es clave en la función de este sistema ya que participa de forma importante en la remodelación vascular de la aterosclerosis y en la enfermedad vascular cerebral (EVC).

Objetivo: examinar la posible contribución de los polimorfismos M235T, T174M y la variante I/D en el gen del angiotensinógeno (*AGT*) en una población de pacientes mexicanos jóvenes con EVC.

Material y método: de 2006 a 2016 se reclutó un total de 224 pacientes con edad  $\leq 45$  años y diagnóstico de EVC isquémico idiopático y el mismo número de controles pareados por edad y género. Se identificó en ambos grupos la variante I/D y dos polimorfismos en el gen de la ECA: M235T y T174M mediante PCR-RFLP.

Resultados: se observó una diferencia significativa en la distribución ( $p=0.01$ ) y la frecuencia alélica ( $p=0.01$ ) del polimorfismo M235T al igual que del T174M ( $p=0.03$  y  $p=0.02$  respectivamente) entre pacientes y controles. Por el contrario, la distribución entre grupos para la variante I/D fue similar ( $p=0.20$ ).

Los factores independientes para EVC isquémico fueron las variantes M235T y T174M, tabaquismo, hipertensión e historia familiar de enfermedad aterotrombótica. Los niveles de angiotensinógeno mostraron estar elevados en el

grupo de pacientes comparado con el grupo control ( $p=0.001$ ). Sin embargo, estos mismos niveles fueron similares en los tres diferentes genotipos. No hubo diferencia en los niveles de AGT entre los tres genotipos.

Conclusiones. Los polimorfismos M235T, T174M y el nivel de AGT representan un riesgo aumentado para EVC en individuos mexicanos jóvenes, no así la variante I/D. Los niveles de AGT fueron mayores en la fase aguda del evento pero no estuvo determinado por los polimorfismos estudiados.

Palabras clave: I/D; M235T, T174M; riesgo genético, evento vascular isquémico idiopático.

## **I. MARCO TEÓRICO**

### **1. Enfermedad vascular cerebral (EVC)**

La enfermedad vascular cerebral se caracteriza por la aparición súbita de déficits neurológicos focales atribuibles a una causa vascular, por lo que su definición es clínica y para sustentar el diagnóstico se requiere de estudios de laboratorio y neuroimagen. La reducción abrupta (isquemia focal cerebral) del flujo sanguíneo por varios segundos y la falta de energía (glucógeno) de las células cerebrales hace que los síntomas aparezcan de inmediato. Cuando se restablece la circulación rápidamente y el paciente se recupera por completo de los síntomas dentro de las primeras 24 horas, el evento se denomina ataque isquémico transitorio (TIA por sus siglas en inglés). Si la isquemia se prolonga, el daño neurológico es permanente (infarto) dada la muerte del tejido cerebral afectado. La nueva clasificación de éste evento propone llamarlo evento isquémico independientemente de que persistan los síntomas.<sup>(1)</sup>

El mecanismo habitual por el que se presenta una isquemia focal o infarto se debe a una trombosis de los vasos cerebrales y a émbolos procedentes de una fuente arterial cercana o del propio corazón.<sup>(1)</sup>

A pesar de una evaluación extensa para identificar el mecanismo que la produce, hasta el 30% del total de casos permanecen inexplicables.<sup>(1)</sup>

Los signos típicos del evento isquémico incluyen debilidad súbita unilateral, parestesias, pérdida de agudeza visual, diplopia, disartria y vértigo entre otros. Hay signos menos comunes como disfagia, estridor, cefalea, movimientos involuntarios, confusión y alteraciones de la conciencia.<sup>(1)</sup>

La enfermedad vascular cerebral puede aparecer incluso desde la etapa perinatal y durante cualquier periodo de la vida <sup>(2)</sup>, pero es más común observarla en personas de edad avanzada. El rango de edad para catalogar un caso como EVC en paciente joven varía entre 45 y 49 años según una revisión del 2015 sobre la epidemiología y prevención de esta enfermedad.<sup>(3)</sup> Además, puede aparecer como una

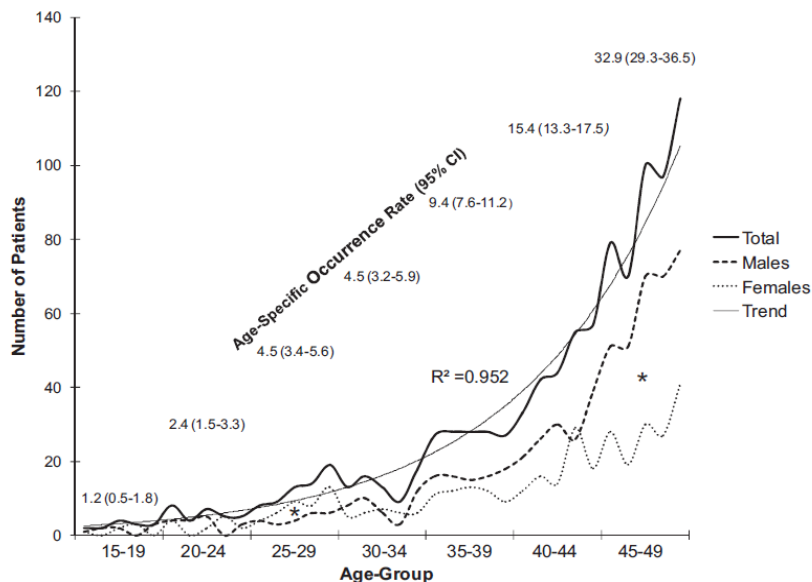
complicación de enfermedades monogénicas como la neurofibromatosis tipo 1<sup>(4)</sup> o presentarse sin éste antecedente.

En forma general, los tipos de EVC pueden separarse en isquémicos (85% de casos) y hemorrágicos (15%).<sup>(1)</sup>

Para su diagnóstico, los avances recientes en la tecnología de los estudios de neuroimagen como son la resonancia magnética (RM) de difusión y de perfusión potenciada, de pared vascular, la angiografía y el ultrasonido doppler transcraneal, permiten determinar los mecanismos de la EVC y reducir el número de casos de causa desconocida, sin embargo, el principal estudio diagnóstico accesible y no invasivo que permite evaluar el mecanismo por el que se presenta la EVC es la resonancia magnética, aunque la tomografía computarizada puede proporcionar evidencia de lesiones que afectan principalmente los vasos de mediano y gran calibre.<sup>(1,5)</sup>

## 2. Epidemiología.-

La prevalencia general de la EVC se estimó en 2.7% entre 2011 y 2014 en los Estados Unidos, aumenta conforme aumenta la edad tanto en varones como mujeres y alrededor de una cuarta parte ocurre en personas menores de 65 años.



Tomado de: Putaala J, Metso AJ, Metso TM, Konkola N, Kraemer Y, Haapaniemi E, Kaste M, Tattilsumak T. Analysis of 1008 consecutive patients aged 15 to 49 with first-ever ischemic stroke. The Helsinki Young Stroke Registry. Stroke. 2009;40:1195-1203



A pesar de los avances en la prevención y tratamiento de la EVC aun representa la primera causa de discapacidad en adultos y la segunda causa de muerte en países desarrollados atribuyéndole el 10.2% de total de muertes según la OMS.<sup>(6)</sup>

La forma más común de la EVC es el tipo isquémico con una proporción entre el 75% al 87% del total de los casos y un alto porcentaje de ellos resulta en severa morbilidad y/o mortalidad.<sup>(7)</sup>

Cada año aparecen alrededor de 15 millones de nuevos casos y de estos, 5 millones mueren y 5 millones quedan con incapacidad permanente.<sup>(8)</sup> Hay estudios en países europeos que informan una incidencia 3 veces mayor de la reportada en los estados Unidos.<sup>(9)</sup> En el Reino Unido la EVC representa el 14% de las muertes y el consumo del 4-5% de presupuesto total anual de los servicios de salud pública en ese país.<sup>(10)</sup>

En el 2017 la American Heart Association informó que la EVC isquémica entre jóvenes (15-44 años) se incrementó entre los años de 1995 y 2010 (muestra tomada de los ingresos hospitalarios a nivel mundial) y que alrededor del 10% de todos los casos tenían entre 18 y 50 años de edad. Para el 2030 se espera un incremento en la mortalidad de cerca del 50% comparado con el número de muertes en el 2012.<sup>(2)</sup>

En Mexico, la EVC es un problema importante de salud pública.<sup>(11)</sup> Es la tercera causa de muerte entre las personas de 60 años o mayores y la quinta a edades entre los 15 a 59 años.<sup>(12,13)</sup>

El 46% del total de muertes se debe a enfermedades no transmisibles<sup>(14)</sup> y en 2016 el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reportó 34,782 casos de muerte por enfermedad cerebrovascular ocupando el 6º lugar de las causas de muerte en orden de importancia.<sup>(15)</sup> (Tabla 1)

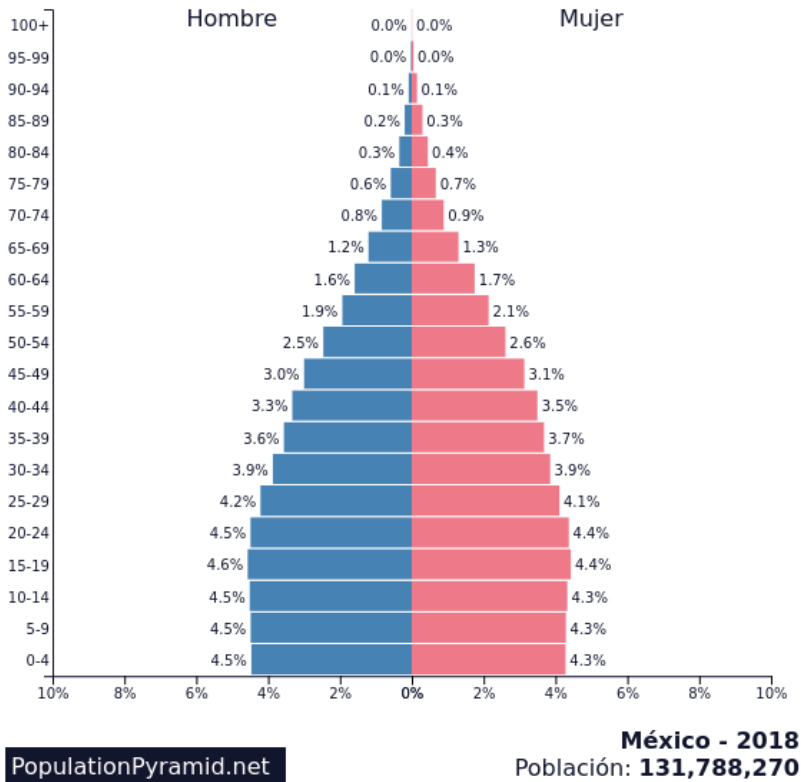
**Tabla 1.- Causas de muerte en orden de Importancia INEGI 2016**

Orden de Importancia	Causas	Clave Lista Mexicana	Defunciones
	<b>Total</b>	<b>01-E59</b>	<b>685,766<sup>b</sup></b>
<b>1</b>	<b>Enfermedades del corazón<sup>c</sup></b>	<b>26-29</b>	<b>136,342</b>
	Enfermedades isquémicas del corazón	28	97,743
<b>2</b>	<b>Diabetes mellitus</b>	<b>20D</b>	<b>105,572</b>
<b>3</b>	<b>Tumores malignos</b>	<b>08-15</b>	<b>82,502</b>
<b>4</b>	<b>Enfermedades del hígado</b>	<b>35L-35M</b>	<b>38,755</b>
	Enfermedad alcohólica del hígado	35L	14,029
<b>5</b>	<b>Accidentes</b>	<b>E49-E53, E57-E58</b>	<b>37,418</b>
	De tráfico de vehículos de motor	E49B	16,179
<b>6</b>	<b>Enfermedades cerebrovasculares</b>	<b>30</b>	<b>34,782</b>

(15) <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

El Registro Nacional Mexicano de Enfermedad Vascolar Cerebral (RENAMEVASC) reportó que un 55.1% de los eventos registrados sucedieron en mujeres y 44.9% en hombres. De todas las enfermedades cerebrovasculares el 51.9% se debió a infarto cerebral (EVC isquémica) de los cuales el subtipo cardioembólico (25%) fue el más común y en el 37% de casos no fue posible determinar la causa. El factor de riesgo vascular mas importante tanto para la EVC isquémica como hemorrágica fue la hipertensión arterial seguido de la diabetes mellitus tipo 2. El 36.8% de los casos tuvieron una edad menor de 45 años, la mayoría fueron infartos cerebrales y hubo mayor numero de mujeres que de hombres.<sup>(16)</sup>

Debido a que la población que envejece va en aumento, que el promedio de vida de las personas se incrementa y tomando en cuenta que la tasa de mortalidad ajustada por edad en la población hispana es hasta del 34%,<sup>(2)</sup> es importante tomar en cuenta la EVC en los programas de prevención y salud pública.<sup>(17)</sup>



### Enfermedad vascular cerebral isquémica.-

En las personas con aterosclerosis intracraneana, una oclusión de rama puede causar infartos subcorticales indistinguibles de los que se deben a una enfermedad de arteria pequeña y, aunque los mecanismos pueden variar en diferentes pacientes, también pueden coexistir. Una oclusión trombótica *in situ* empieza con la fisura de una placa aterosclerótica que propicia la formación de un coágulo, el cual puede liberarse dando origen a un embolismo arterio-arterial. La inestabilidad de la placa se relaciona con factores como la inflamación, autoinmunidad o la predisposición heredada y éstos podrían estar en relación con la progresión de la arteriosclerosis, además de los factores de riesgo tradicionales.

El embolismo arterio-arterial se genera por la liberación del trombo o una parte de éste, el cual viaja a las ramas distales. La ruptura de la superficie de la placa puede también liberar detritus provocando embolismo de colesterol.<sup>(18)</sup>

En la enfermedad oclusiva de rama, además del ateroma que obstruye la luz, puede haber lipohialinosis (por cambios hipertensivos en la media de los vasos pequeños) que desorganiza el trayecto arterial por microdissección, hemorragia en placa y fibrina. Sin embargo, no siempre se encuentra el antecedente de hipertensión arterial en los pacientes afectados.<sup>(18)</sup>

En la EVC por hipoperfusión cerebral, el desarrollo de la placa ateromatosa con el tiempo disminuye la luz vascular provocando turbulencia y aumento en la velocidad de flujo sanguíneo que provoca estrés en el endotelio y propicia la fisura de la placa, activándose los mecanismos de coagulación.<sup>(18)</sup>

La clasificación de los mecanismos que originan la EVC se basa en las manifestaciones clínicas de los pacientes, los resultados de neuroimagen y otros estudios clínicos. Existen varios tipos de clasificación; unas concordantes entre sí y otras que desarrollaron una forma de homogenizar los hallazgos clínicos de modo que pudiesen comparar las proporciones de subtipos entre las diferentes clasificaciones y proponer una con la ventaja de catalogar en el subtipo de etiología indeterminada la menor proporción de pacientes (CCS, ASCO).<sup>(19-21)</sup>

Dada las diferencias en el año en que se publicaron, el tipo de diseño, los estudios diagnósticos necesarios para la tipificación del evento, el grado de confiabilidad interobservador y la proporción de acuerdo entre clasificaciones, se recomienda utilizar una sola para cualquier tipo de investigación ya que ayuda en la selección y comparación de grupos homogéneos de pacientes; por ejemplo aquellos casos en los cuales no fue posible determinar el mecanismo causal (el tipo con mayor porcentaje de la muestra en la mayoría de estudios realizados con cualquier clasificación de las antes mencionadas). Por otra parte, el contar con un grupo de pacientes seleccionados de forma sencilla y con subtipos específicos es de mucha utilidad para contestar preguntas que involucren a factores de riesgo heredables como los polimorfismos, dado que es posible analizar los resultados estratificando las categorías.<sup>(21-25)</sup>

Para fines de homogeneidad en informes de investigación se ha utilizado la clasificación desarrollada para la “Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment”

(TOAST por sus siglas en inglés), cuyo acuerdo interobservador es variable ( $\kappa=0.42$ - $\kappa=0.64$ ) pero muy fácil de aplicar en el contexto clínico con pocos recursos.<sup>(24,26)</sup>

TOAST es un sistema de clasificación que utiliza las características clínicas de los pacientes con EVC para establecer los mecanismos de la enfermedad. Divide al evento isquémico agudo en cinco categorías.<sup>(26)</sup>

1.- Aterosclerosis de grandes arterias.

2.- Cardioembolismo.

3.- Oclusión de pequeños vasos.

4.- Otras causas determinadas (no ateroscleróticas, vasculopatías, estados de hipercoagulabilidad o trastornos hematológicos).

5.- Etiología indeterminada:

a). Dos o más causas indefinidas o probables.

b). Evaluación negativa a pesar del abordaje diagnóstico.

c). Evaluación incompleta.

A diferencia de otras clasificaciones, TOAST no tiene problemas de accesibilidad, es la más utilizada en la mayoría de los trabajos sobre EVC en jóvenes, los subtipos pueden diferenciarse con el uso de técnicas imagenológicas accesibles en todos los países y es de utilidad clínica, lo que ayuda a comparar resultados en los estudios de asociación realizados en diferentes grupos étnicos. Además se ha propuesto que la disponibilidad de información diagnóstica objetiva reduce el componente subjetivo para la subtipificación, independientemente de cuál sea el sistema de clasificación que se utilice y, por el contrario, el exceso de información sin criterios normados puede reducir el acuerdo entre los tipos diferentes de método.<sup>(21,22,24,27)</sup>

La proporción observada de los subtipos de la enfermedad isquémica cerebral pueden variar en los diferentes países, el sexo estudiado y el sistema de clasificación que se utilice (Tabla 2).

**Tabla 2.-** Distribución del subtipo de EVC isquémico en diferentes países según la clasificación TOAST.

Subtipo de EVC isquémico	Cardioembólico (%)	Enfermedad vaso pequeño (%)	Aterosclerosis de arteria grande (%)	Indeterminado (%)	Otras causas determinadas (%)
Putala et al, 2009. Finlandia <sup>(10)</sup>	18.7	13.9	8.4	33	
Chung et al, 2014. Corea <sup>(4)</sup>	23.0	21.4	37.6	14%	2.9
Desai et al, 2014. Arabia S. <sup>(11)</sup>	19.34	5.33	8.74	65.3	1.3
McArdle et al. (SiGN), 2014. Internacional <sup>(6)</sup>	27.8	18	15.5	34.4	4.2
Gökçal et al, 2017. Turquía <sup>(8)</sup>	19.2	11.3	13.2	41.1	15.2
Wei et al, 2018. China <sup>(7)</sup>	39.8	6.1	33.9	18	1.4
Suecia*	46	2.5	5.4	22.8	46
Suiza*	32.7	4.7	12.1	20.6	29.9
Italia*	23.7	33.1		35.1	8.1
Brasil*	28.3	12.5	8.5	16	34.9
México*	24	3		32	40
Canadá*	14	8	6	44	28
USA (3 estudios)*	14-19	3-21	9-21.6	14.6-26	24-44
Túnez*	11.8	8.8	6.9	35.3	37.2

(28) Kefi A, Larbi T, Abdallah M, El Ouni A, Bougacha N, Bouslama K, Hamzaoui S, M'rad S. Young ischemic stroke in Tunisia: a multicentric study. Int J Neurosci. 2017;127:314-319.)

Para explicar estas diferencias, algunos autores mencionan que el grupo étnico es un factor, entre otros, que puede influir en la frecuencia del subtipo además de la edad. Sin embargo hay autores que, utilizando un abordaje molecular para estudiar la heredabilidad en cada subtipo, han observado hasta un 66% para el tipo de aterosclerosis de grandes arterias y el cardioembólico (33-60%).<sup>(29,30)</sup>

### **Factores de riesgo ambientales asociados a EVC isquémico.-**

Aunque existe controversia en la definición del paciente joven con EVC, diversos estudios los catalogan como aquellos individuos menores de 40 a 55 años

considerando el punto de corte justo cuando se ha observado un cambio en la prevalencia de los factores modificables.<sup>(27)</sup>

Algunos reportes de EVC isquémico en adultos jóvenes que han utilizado la clasificación de los tipos del estudio TOAST han mostrado que hay una proporción importante de casos que tienen varios factores de riesgo con frecuencia observados a mayor edad (aterosclerosis, enfermedad de pequeños vasos, disección de arteria cervical).<sup>(21)</sup> Otros concluyen que los factores de riesgo en jóvenes son los mismos que los encontrados a mayor edad, pero la proporción de éstos es diferente entre los subtipos de EVC isquémico. Los autores resaltan la importancia de analizar su efecto sobre los factores heredables, separando a los pacientes por grupos de edad.<sup>(27,31-33)</sup>

Los principales factores de riesgo modificables para EVC isquémico en jóvenes son: dislipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial (HAS) y diabetes mellitus (DM) entre otros. El orden de frecuencia varía según las poblaciones estudiadas y la edad del grupo de pacientes incluidos.<sup>(2)</sup> (Tabla 3)

**Tabla 3.-** Proporción de pacientes jóvenes con EVC con factores de riesgo cardiovascular en diferentes poblaciones. <sup>(30,34,36,37)</sup>

País y autores	Dislipidemia (%)	Obesidad (%)	Diabetes mellitus (%)	Hipertensión arterial (%)	Tabaquismo (%)
México. Márquez y cols. 2013	27 (isquémico)	51	35-39	46.5-70	31.9
Brasil. Montanaro y cols. 2017	7.5	3.7	3	20.1	14.2
Costa Rica. Torrealba y cols. 2018	36.3		31.9	78.8	
	Prevalencia (%)				
American Heart Association. Benjamin y cols. 2018	18		20	52	46
Finlandia. Smajlovic y cols. 2015 <sup>&amp;</sup>	60			39	44
Europa <sup>&amp;</sup>	46			36	49

En cuanto al EVC isquémico se habla también de factores de riesgo no tradicionales e incluyen a la obesidad, síndrome metabólico, apnea del sueño, insomnio, inflamación crónica, enfermedad renal crónica, periodontitis, depresión, dieta y nutrición. Además, la exposición al estrés psicosocial, infección y alcoholismo entre otros factores ambientales pueden ejercer un efecto transitorio en el proceso fisiopatológico que desencadena el EVC, aunque es difícil saber si se trata de factores de riesgo emergentes o nuevos factores desencadenantes de la enfermedad.<sup>(38)</sup>

Se recomienda también que durante su estudio se tenga en cuenta enfermedades como la esclerosis múltiple, los trastornos somatomorfos, migraña con aura prolongada, déficits focales postictales, neoplasias y neuroinfección entre otros.

Tabaquismo: Es un factor importante para infarto cerebral en adultos jóvenes. El riesgo aumenta a mayor duración y dosis de consumo con OR de 2.2 si el consumo es de 1 a 10 cigarrillos por día y hasta 9.1 si el consumo es de 40 o más.<sup>(39)</sup>

Migraña: Se ha mostrado que el riesgo de EVC isquémico en personas que tuvieron migraña con aura se duplica comparado con personas sin migraña. Una edad menor de 45, hábito tabáquico y uso de hormonales orales confieren un riesgo agregado.<sup>(40)</sup>

Embarazo y puerperio: Aunque el riesgo de EVC isquémico para las mujeres embarazadas aumenta en los días previos al nacimiento y 6 semanas posteriores al parto, esta enfermedad es rara durante la etapa de embarazo y puerperio. Sin embargo hay una proporción importante de pacientes jóvenes con trombosis venosa cerebral.<sup>(41)</sup>

Hormonales orales: Esta asociación es controversial. De acuerdo a los resultados de algunos metanálisis, el riesgo se eleva si las pastillas tienen alto contenido de estrógenos. No se ha observado incremento en el riesgo con los tratamientos a base de progestágenos.<sup>(42)</sup>

Adicciones: Varias sustancias de uso recreativo presentan EVC como una de las complicaciones y esta relación alcanza hasta el 12% en pacientes jóvenes.<sup>(43,44)</sup>



## **Herencia y EVC isquémico.-**

Como se ha descrito previamente, muchos de los eventos cerebrovasculares en adultos jóvenes son de causa indeterminada o rara, por lo que es muy probable que la genética de los individuos influya de modo importante. La mayor evidencia de que las alteraciones genéticas son causa de infarto cerebral viene de algunas formas presentes en padecimientos con modelo de herencia mendeliana, aunque éstas solo constituyen un porcentaje pequeño (<5%) del total de los casos. Entre estas enfermedades se encuentran la arteriopatía cerebral con infartos y leucoencefalopatía autosómica dominante (CADASIL), la arteriopatía cerebral con infartos y leucoencefalopatía autosómica recesiva (CARASIL), la miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodio parecido a la embolia (MELAS) y la enfermedad de Fabry.<sup>(45,46)</sup>

Sin embargo estas alteraciones constituyen variantes patogénicas (mutaciones) en los genes que dan por resultado un comportamiento anormal de la proteína que codifican, lo que resulta en el comportamiento clínico multisistémico del padecimiento.

Desde el punto de vista de la causalidad, la EVC es una enfermedad compleja en donde intervienen tanto factores heredables como ambientales. Es difícil el cálculo de su heredabilidad (efecto de los genes sobre la varianza de la enfermedad) y sus características son el fundamento para los estudios moleculares en busca de variantes genómicas que puedan aportar mayor conocimiento de su etiopatogenia.

Se puede decir que los individuos afectados tienen una predisposición heredada poligénica donde no se conoce con exactitud cuáles, cuántos y cómo interactúan entre sí los genes que predisponen a la enfermedad, además de cómo éstos modifican su expresión a través de la interacción con los factores del medio ambiente. Ya que éstos últimos pueden modificarse, son de gran interés en la prevención y tratamiento de éste amplio grupo de padecimientos.<sup>(47)</sup>

La EVC reúne las características del modelo de herencia multifactorial: a) es un padecimiento común, b) su frecuencia varía con la edad, c) la presentación de la

enfermedad se ve influenciada por factores ambientales de riesgo, d) puede observarse con mayor frecuencia en un sexo, e) predomina en ciertos grupos étnicos (Tabla 1), f) existe agregación familiar y g) a mayor cantidad de predisposición heredada es mayor la probabilidad de que la enfermedad aparezca.<sup>(47)</sup>

Una historia clínica minuciosa en el interrogatorio -y poniendo especial interés en los antecedentes heredofamiliares- puede mostrar tanto historia familiar positiva para EVC en otros miembros de la familia, como también el antecedente de una enfermedad con un modelo de herencia mendeliana donde la EVC isquémica es parte del cuadro clínico.<sup>(32)</sup> Por lo tanto, la enfermedad en un individuo puede estar presente en forma aislada o en forma sindrómica. (Tabla 4)

Los padecimientos mendelianos asociados con mayor frecuencia a EVC isquémica se presentan en la siguiente tabla. En ella puede observarse que el modelo de herencia que predomina es el autosómico recesivo por lo cual el antecedente de afectados en la hermandad puede ser difícil de encontrar porque en muchas ocasiones las familias tienden a ser de pocos miembros.

**Tabla 4.-** Enfermedades con modelo de herencia mendeliana que pueden presentar EVC isquémico.

<b>Enfermedades con posibilidad de EVC isquémico.</b>			
<b>Enfermedad</b>	<b>Locus/Modelo de herencia</b>	<b>Gen(es)</b>	<b>Función</b>
MELAS	Herencia mitocondrial	<i>tRNA(Leu) A3243.</i> <i>tRNA(Leu) T3271C</i> <i>Otros</i>	Proteínas de la cadena respiratoria.
CADASIL	19p13.1 (AD)	<i>NOTCH3</i>	Diferenciación de astroglia
CARASIL	10q26.3 (AR)	<i>HTRA1</i>	Proteasa de matriz extracel.
Fabry	<i>Xq22.1 (ligada al X)</i>	<i>GLA</i>	Enzima lisosomal
HERNS	3p21.3 (AD)	<i>TREX1</i>	Inmunidad
Trombofilias hereditarias			
Osteogénesis imperfecta tipo			
Ehlers-Danlos tipo IV	2q32.2 (AD)	<i>COL3A1</i>	Matriz extracelular de tejidos
Marfan	15q21.1 (AD)	<i>FBN1</i>	Microfibrillas extracelulares de

			tejido conectivo elástico y no elástico
<i>Pseudoxantoma elasticum</i>	16p13.11 (AR)	<i>ABCC6</i>	Recambio de tejido conectivo
Homocistinuria	21q22.3 (AR)	<i>CBS</i>	Enzima que conjuga homocisteína y serina.
<b>Enfermedad con posibilidad de EVC isquémico y hemorrágico</b>			
<b><u>Enfermedad</u></b>	<b><u>Locus/Modelo de herencia</u></b>	<b><u>Gen(es)</u></b>	<b><u>Función</u></b>
Anemia células falciformes	11p15.4 (AR)	<i>HBB</i>	Cadena $\beta$ de Hb del adulto
Moyamoya 2	17q25.3	<i>RNF213</i>	Función de ATPasa
Telangiectasia hemorrágica hereditaria			
Enfermedad de pequeños vasos	13q34 (AD)	<i>COL4A1</i>	Inhibe angiogenesis inducida por hipoxia.
Migraña hemipléjica familiar 1 y 2	1q23.2, 19p13 (AD)	<i>ATP1A2/CACNA1A,</i>	Contractilidad cardiaca./ forma neuroendócrina cerebral relacionada con corrientes de Ca.
EVC y vasculopatía con mutaciones en ADA2	22q11.1 (AR)	<i>CECR1 (ADA2)</i>	Desarrollo tisular
Neurofibromatosis tipo 1	17q11.2 (AD)	<i>NF1</i>	Expresión principal de neurofibromina en cerebro

Tomado de: <sup>(45)</sup>Terni E, Giannini N, Brondi M, Montano V, Bonuccelli U, Mancuso M. Genetics of ischaemic stroke in young adults. *BBA Clin.* 2014;29:96-106. <sup>(46)</sup>Majersik JJ. Single gene causes of stroke. *Semin Neurol.* 2017;37:351-365.)

La historia familiar, la edad de presentación, las características fenotípicas visibles, la presencia de migraña con aura, sordera, signos asociados a privación energética celular y algunos datos imagenológicos frecuentes en la imagen de resonancia magnética pueden orientar el diagnóstico hacia alguno de los padecimientos mendelianos.<sup>(46)</sup>

Si bien existen personas con EVC isquémico por un padecimiento sindrómico, la mayoría de casos ocurren en forma no sindrómica o aislada; es decir, sin formar parte de un padecimiento monogénico, cromosómico o con herencia no clásica. En los casos aislados la historia familiar positiva se ha considerado como uno de los factores de riesgo clásicos y está presente hasta en dos terceras partes de los casos de EVC en jóvenes, pero podría servir como indicador de una probable entidad hereditaria en los casos criptogénicos y en aquellos con eventos recurrentes. Esto

ayudaría a modificar el abordaje diagnóstico habitual, solicitando pruebas diagnósticas moleculares dirigidas a una enfermedad hereditaria determinada y, en caso de confirmación, otorgar asesoramiento genético a la familia, establecer la vigilancia periódica para problemas sistémicos asociados e iniciar la prevención específica de complicaciones.<sup>(45,46,48)</sup> Su proporción puede variar en los afectados de diferentes grupos humanos y va desde 7.4% en Israel hasta 36% en la población méxicoamericana (10.8% Tunez, 12.3% Corea, 37.3% Europa).<sup>(28,49,50-52)</sup>

El antecedente heredofamiliar positivo también aumenta el riesgo de EVC en los hermanos del probando, como lo ha informado el estudio Framingham del 2010 donde el riesgo para la descendencia de un paciente con EVC a los 65 años es 2 veces mayor que el de aquellos sin el antecedente de un progenitor afectado. Se ha observado también que a menor edad al primer episodio del progenitor(a) y/o hermano(a), aumenta también la posibilidad de un nuevo evento en el paciente (recurrencia de hasta 3 veces más respecto a los pacientes sin el antecedente).<sup>(51,53)</sup>

En una revisión sistemática realizada en el año 2004, se concluye que existe asociación entre la historia familiar positiva y el aumento (30 al 76%) en el riesgo para EVC con un OR=1.3-1.8,<sup>(54)</sup> pero si la muestra sólo incluye mujeres menores de 50 años, el OR=3.2.<sup>(55)</sup>

Si bien se ha mencionado que el sesgo de recuerdo y el diseño de los estudios pueden variar el estimado de la contribución genética, un estudio sobre heredabilidad en población europea, utilizando microarreglos, observó cifras más altas (42%) en menores de 55 años respecto a los mayores de esa edad (34%) que, aunque sin significancia estadística, es una mejor forma de evitar al menos el sesgo de recuerdo y la falta de información en los diseños retrospectivos.<sup>(56)</sup>

La historia familiar detallada sirve además para identificar la presencia de otras enfermedades monogénicas cuyo cuadro clínico incluye la EVC.<sup>(1,2,45,57)</sup> (Tabla 4)

La participación de los factores heredables que influyen en el riesgo para EVC - como en muchas malformaciones congénitas aisladas y enfermedades comunes- se ha estudiado también observando el porcentaje de concordancia en gemelos monocigotos respecto a la de dicigotos del mismo sexo. A pesar de que existen

pocos estudios disponibles y no todos reproducen los resultados, la concordancia en monocigotos llega a ser de hasta un 60%, lo que demuestra el impacto de los factores heredables en la presentación de la enfermedad. Sin embargo los estudios de concordancia no tienen la capacidad de excluir la influencia de otros factores modificables presentes en el ambiente que comparten los hermanos.<sup>(2,58-60)</sup>

Dado que la sobrevida ha aumentado y los casos de EVC tienden a elevarse con la edad, el interés por encontrar marcadores biológicos y factores heredables de riesgo ha llevado a plantear la posibilidad de que los diferentes tipos de EVC isquémico tengan variantes no patogénicas (polimorfismos) en común y una posible heredabilidad compartida. Un estudio reciente utilizando la técnica de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) observó que los polimorfismos presentes en un subtipo isquémico de EVC difieren respecto a los demás y se propone que podrían tener procesos patogénicos diferentes a nivel genético. Estos hallazgos apoyan la necesidad de contar con procesos diagnósticos específicos para pacientes que compartan tanto la edad como el subtipo de EVC para que puedan reclutarse en otros estudios, no sólo genómicos sino también terapéuticos.<sup>(61)</sup>

### **Otros factores de riesgo heredables: Variantes no patogénicas asociadas a EVC.-**

Se ha estudiado una cantidad importante de genes candidatos con resultados controversiales y entre ellos están los del metabolismo de la homocisteína del sistema de coagulación y fibrinolítico, los de glicoproteínas de plaquetas, del metabolismo lipídico y los relacionados con el sistema renina-angiotensina-aldosterona.<sup>(62-66)</sup> (Tabla 5)

**Tabla 5.-** Polimorfismos de diferentes genes asociados a EVC.

<b>Autores y año</b>	<b>Gen y polimorfismo de riesgo</b>	<b>OR</b>
Alhazzani AA, y cols (2018)	Factor V, G1691A	OR 1.84; 95% IC:1.47 a 2.30 en ≤40 años
Ruiz-Franco, y cols (2015)	Homocigotos TT de C677T del gen <i>MTHFR</i> .	OR 2.04, CI 95 % 1.53–2.72

Beata Sarecka-Hujar, y cols (2017)	Genotipos GA+AA de 20210A del gen <i>FII</i> .	OR 1.69; 95% IC:1.25 a 2.28
Kolovou V, y cols. (2015)	Genotipos T vs M de M235T y T174M del gen <i>AGT</i>	OR:1.57; IC:1.01-2.44
Jiménez-González, y cols. (2018)	Glu298Asp del gen <i>TAFI</i> Y C677T de <i>MTHFR</i>	-
Atadzhanov M, y cols (2013)	<i>APOE</i> $\epsilon_2\epsilon_4$	-
Wei LK, y cols (2015)	C677T del gen <i>MTHFR</i>	-

### **Polimorfismo de inserción/delección (I/D) en el gen de la ECA.**

La enzima renina, denominada ECA (dipeptidil-carboxipeptidasa 1) se expresa en pulmón, riñón, cardiomiocitos y es abundante en el endotelio vascular cerebral. Su actividad normal mantiene en homeostasis la presión sanguínea debido a su función en el sistema renina-angiotensina (SRA).<sup>(67,68)</sup>

A este sistema se le considera también entre las causas de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis, siendo ambas catalogadas como factores de riesgo para EVC. Su importante participación se ha confirmado a través del aumento en la expresión (mRNA) de genes relacionados con el sistema renina-angiotensina en modelos animales que desarrollan hipertensión arterial <sup>(68,69)</sup> y en casos de infartos lacunares en población japonesa, donde el polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno (AGT) mostró una asociación significativa con la gravedad de infartos lacunares en pacientes jóvenes ( $p < .05$ ).<sup>(70,71)</sup>

La ECA convierte la angiotensina 1 en angiotensina 2, cuya función es la de un potente vasoconstrictor, e inactiva a la bradiginina, que a su vez funciona como vasodilatador. <sup>(72-74)</sup>

Un incremento continuo de los niveles de angiotensina 2 y una disminución en la concentración de bradiginina resultan en un estado crónico de incremento en la resistencia vascular y en consecuencia, en aumento de la presión arterial. Además, angiotensina 2 promueve la proliferación de las células de músculo liso, la migración, activación y adhesión de los macrófagos a la pared vascular permitiendo el desarrollo de la placa aterosclerosa <sup>(74-77)</sup>

El gen de la ECA (*ACE* por sus siglas en inglés) se localiza en 17q23, consiste en 63.4 Kpb (miles de pares de bases), tiene 26 exones, 25 intrones y codifica para una proteína de 1,261 aminoácidos con peso molecular de 80,073 Daltones.<sup>(78,79)</sup> Este gen tiene varias regiones polimórficas y una de las más estudiadas es la región de inserción/delección (I/D) de 287 pb en la secuencia de repetidos tipo Alu localizada en el intrón 16. El alelo silvestre es aquel con la inserción (I).

Rigat y cols. fueron los primeros en describir el polimorfismo I/D. Las personas con genotipo D/D muestran un incremento en la concentración plasmática de la enzima comparado con los pacientes con genotipos I/I o I/D. El polimorfismo I/D contribuye aproximadamente en un 50% en las variaciones de la concentración enzimática en plasma. Sus hallazgos se reprodujeron en el estudio de Catto y cols. en 1996 <sup>(80,81)</sup>

El genotipo D/D se asocia con un incremento en los niveles y la actividad de la enzima y ha mostrado ser un factor de riesgo para infarto agudo del miocardio (IAM) y enfermedad coronaria <sup>(74,82,83-86)</sup>

Previamente Kato y cols. habían demostrado una asociación entre el polimorfismo inserción/delección del gen *ACE* y el desarrollo de enfermedad cardiovascular <sup>(87)</sup> y su gravedad, donde el genotipo D/D mostró asociación con un empeoramiento en fracción de eyección y el diámetro sistólico y diastólico del ventrículo izquierdo.<sup>(88)</sup>

El producto del gen *ACE* también se encuentra en el miocardio <sup>(89-91)</sup> y su expresión esta incrementada en procesos de remodelación y aterosclerosis.<sup>(92-94)</sup> Esto concuerda con los hallazgos en diferentes estudios: un meta-análisis en el cual se incluyeron 10,547 sujetos chinos con hipertensión esencial, demostró una asociación con el polimorfismo I/D.<sup>(87)</sup>

Otro de igual diseño identificó que éste mismo se asocia a EVC, <sup>(95)</sup> resultado que fue corroborado por Markoula y cols. en población griega.<sup>(96)</sup>

La asociación del polimorfismo I/D con EVC isquémica se ha mostrado en diferentes poblaciones y con resultados variables. Zhang y cols. analizó 50 estudios en un

meta-análisis del 2012, el cual mostró que el alelo D/D tiene 87% mayor riesgo en asiáticos que en población europea y el riesgo elevado mayor se observó en estudios con muestra de casos hospitalarios. Este meta-análisis concluye que *ACE* es un buen gen candidato para la EVC, la plausibilidad biológica sugiere que podría estar modulando el riesgo para EVC isquémica. Por otra parte menciona el posible papel del grupo étnico estudiado respecto a la variación en las frecuencias del genotipo asociado a EVC y los factores del medio ambiente en el que viven los diferentes grupos humanos.<sup>(97)</sup> Sin embargo, el meta-análisis en población del norte de la India concluyó que no existe asociación estadísticamente significativa entre el genotipo D/D y EVC isquémico y el mayor riesgo se observó con éste mismo genotipo y EVC de pequeños vasos ,aunque su significancia fue limítrofe.<sup>(98)</sup>

### **Polimorfismo T174M en el gen del angiotensinógeno y la EVC**

El gen del angiotensinógeno (*AGT*) se localiza en 1q42.2. Aunque existen diversos polimorfismos en el gen, el más estudiado es M235T, <sup>(99-100)</sup> el cual se ha asociado con el desarrollo de enfermedad cardiovascular <sup>(101)</sup> y, en algunos estudios,<sup>(102,103)</sup> pero no en todos,<sup>(104,105)</sup> ha mostrado asociación con incremento en la concentración sanguínea de angiotensinógeno.

Previos estudios han demostrado una asociación entre el polimorfismo M235T y el desarrollo de hipertensión arterial e infarto agudo de miocardio y otros más lo describen como un factor de riesgo para el desarrollo de EVC en varios grupos humanos.<sup>(106-110)</sup>

El gen *AGT* tiene un polimorfismo que resulta en una substitución del amino ácido de treonina por una metionina en la posición 174 en el exón 2. Previos estudios han demostrado que éste se asocia con el desarrollo de hipertensión y de enfermedad coronaria,<sup>(70,111-112)</sup> aunque dicha asociación no ha sido demostrada por otros investigadores.<sup>(113-115)</sup> Así también se ha informado de su asociación con la EVC, pero los resultados son aún contradictorios.<sup>(116)</sup>

En un estudio previo del mismo grupo de trabajo del actual, se ha demostrado que la hipertensión es el segundo factor de riesgo asociado a la EVC en sujetos jóvenes mexicanos y debido a que las variantes polimórficas propuestas en el



presente trabajo de investigación se asocian al desarrollo de la hipertensión, se decidió realizar el estudio para definir su asociación como factores de riesgo de dicha enfermedad.<sup>(63)</sup>

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La EVC representa una de las causas más importante de morbi-mortalidad en el mundo. En México se reporta como la tercera causa de muerte y es altamente discapacitante, por lo que constituye un problema de salud pública de alto costo en su tratamiento médico. El costo por atención del cuadro agudo es de más de \$100,000 sin incluir gastos de rehabilitación, pensión y medicamentos necesarios por tiempo prolongado (anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios).

En el 50% de los pacientes jóvenes no se encuentra una etiología que justifique el evento agudo, no obstante, se han descrito diversos polimorfismos en varios genes asociados a la EVC a nivel mundial. En nuestro país los únicos factores que se consideran de riesgo son enfermedades como la HAS, la DM, dislipidemia y obesidad así como otros factores modificables como el tabaquismo por lo que la identificación y caracterización de estos polimorfismos resulta ser muy importante en la prevención, pronóstico y tratamiento en este tipo de pacientes.

Debido a lo anterior iniciamos el primer estudio en el IMSS para identificar factores genéticos de riesgo asociados a la EVC en mexicanos. Nuestra propuesta es continuar con la identificación de otros genes asociados a riesgo o con efecto protector para dicha enfermedad, dado que en jóvenes afectados podrían participar de manera importante por el poco tiempo de exposición a los factores de riesgo modificables en comparación con los adultos mayores.

Los resultados obtenidos del presente estudio nos ayudarían a entender aún mejor las bases moleculares y fisiopatológicas de la EVC en pacientes jóvenes de nuestra población y con ello poder prevenir el posible desarrollo de dicha enfermedad en los familiares de los pacientes mediante la identificación de grupos de riesgo.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La enfermedad vascular cerebral es la tercera causa de muerte en nuestro país y en aproximadamente un 50% no se encuentra una causa aparente, por lo que se plantea el estudio de algunas variantes genéticas (polimorfismos) que pudieran representar un factor de riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad en nuestra población. De ahí surgió la pregunta:

¿Existe asociación entre los polimorfismos I/D en el gen de la ECA, el M235T y el T174M en el gen del angiotensinógeno y la EVC en pacientes jóvenes mexicanos?

### **IV. HIPÓTESIS**

- Los polimorfismos propuestos están asociados con un OR al menos de 2 en la enfermedad vascular cerebral de pacientes jóvenes mexicanos.

### **V. OBJETIVO**

- Determinar si existe asociación entre los polimorfismos inserción/delección en el gen de la ECA, el M235T, T174M en el gen del angiotensinógeno y la EVC en pacientes jóvenes mexicanos.

## VI. MATERIAL, PACIENTES Y METODOS

### 1) Diseño del estudio:

- a. Se trata de un proyecto de investigación clínica que parte de pacientes que ya tuvieron el desenlace y controles sanos. El diseño adecuado para contestar la pregunta de investigación es el de casos y controles.

#### CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO (EJES DE LA INVESTIGACION)

Por el control de la maniobra	Observacional
Por la medición en el tiempo	Transversal
Por la dirección de la investigación	Retrospectivo
Por el tipo de muestreo	No aleatorio
Por el número de grupos	Comparativo

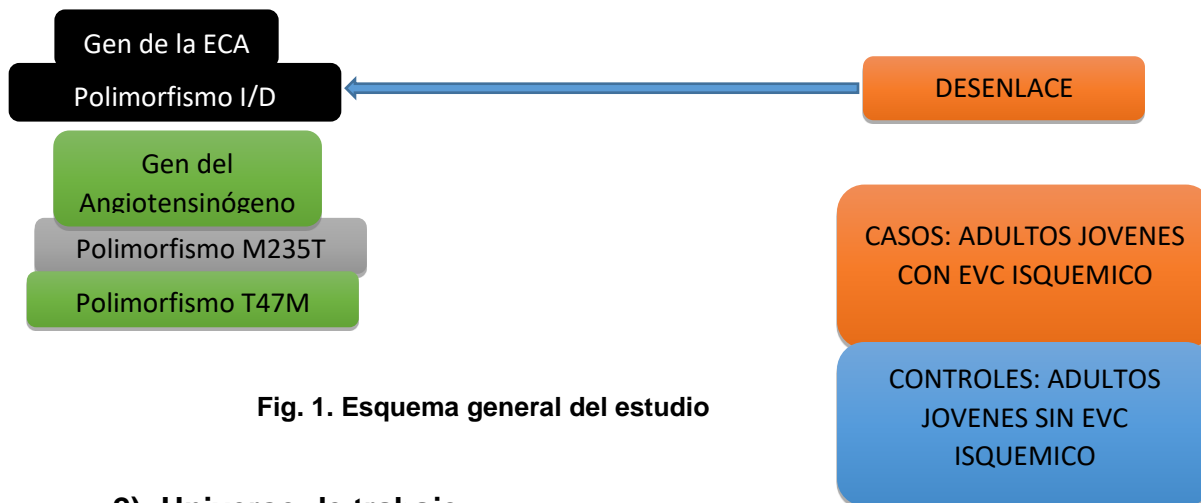


Fig. 1. Esquema general del estudio

### 2) Universo de trabajo

- a. El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital General Regional No. 1 Carlos MacGregor Sánchez Navarro.
- b. Periodo de realización del estudio: Marzo 2017 a febrero 2018.

### 3) Selección de la muestra

#### 3.1. Tipo de muestreo:

Consecutivo no probabilístico.

Debido a que es una Unidad de Investigación Médica dedicada al estudio del paciente con enfermedad vascular cerebral isquémica en el IMSS, se cuenta con una lista de pacientes de edad  $\leq 45$  años que han sido referidos a la unidad con

diagnóstico de EVC y que acuden para continuar con su terapia y control con anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios. Se invitó a participar en el protocolo tanto al grupo de casos como de controles y a los que aceptaron se les citó en día y hora determinados para otorgarles una explicación en extenso, firma de la carta de consentimiento informado y toma de muestra. Ambos grupos fueron pareados por edad y sexo y cuando fue posible, por la clínica de adscripción que correspondía a cada paciente incluido.

### 3.2. Grupos de estudio:

A) Definición operacional de CASO: Paciente adulto menor de 45 años con déficit neurológico focal con más de 24 horas de duración y con evidencia de lesión isquémica por neuroimagen.

B) Definición operacional de CONTROL. Paciente adulto menor de 45 años, sin evidencia clínica o imagenológica (TAC) de enfermedad vascular cerebral que aceptó participar en el estudio. Se seleccionaron para parearlos con los casos por sexo y edad +/- 5 años.

### 3.3. Criterios de inclusión para los casos:

- a).- Pacientes de cualquier sexo.
- b).- Edad menor o igual a 45 años.
- c).- Pacientes con diagnóstico clínico, tomográfico y resonancia magnética de enfermedad vascular cerebral.

### 3.4. Criterios de no inclusión y exclusión para el grupo control

- Que no aceptaron participar en el estudio.
- Diagnóstico de algún proceso patológico después de haber sido incluido en el estudio (clínicamente o por laboratorio).
- Que estuviesen utilizando terapia anticoagulante.

### 3.5. Criterios de no inclusión y exclusión para pacientes con EVC

- Pacientes que no aceptaron participar.
- Que padecían trombofilia congénita o adquirida.
- Diagnóstico de EVC hemorrágico.
- Diagnóstico de disección arterial o cardioembolismo.

#### **4) Tamaño de la muestra**

Se calculó el tamaño de la muestra con base en lo demostrado en otras poblaciones y de acuerdo a la diferencia de proporciones encontrada para la presencia de los polimorfismos I/D, M235T y T174M entre enfermos y sanos. Se utilizó la fórmula para la diferencia de proporciones. Se consideró un valor alfa de 0.05 y un poder estimado a priori de 0.80 (beta 0.20).

#### **5) Descripción de las variables:**

##### **VARIABLES INDEPENDIENTES:**

##### **1. Presencia del polimorfismo I/D en el gen de la enzima convertidora de angiotensina.**

a) Definición conceptual: Pérdida o ganancia de 287 pares de bases (pb) en el intrón 16 del gen de la enzima convertidora de angiotensina.

b) Definición operacional: Presencia de una banda fluorescente de 190 pb para la delección o de una de 490 pb para la inserción, observada en un gel de agarosa.

c) Tipo de variable: cualitativa.

d) Escala de medición: nominal, dicotómica.

e) Unidades de medición: si/no.

Homocitotos I= 480, homocigotos D= 190, heterocigotos= 480/190

## **2. Presencia del polimorfismo M235T en el gen del angiotensinógeno.**

a) Definición conceptual: Variación M235T en la secuencia de ADN en el gen del angiotensinógeno que produce una substitución del aminoácido metionina por treonina en la posición 235 de la proteína.

b) Definición operacional: Presencia de una banda fluorescente de 303 pares de bases (pb) en vez de una de 266 pb en un gel de agarosa.

c) Tipo de variable: cualitativa

d) Escala de medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de medición: si/no

## **3. Presencia del polimorfismo T174M en el gen del angiotensinógeno.**

a) Definición conceptual: Variación en la secuencia de ADN en el gen del angiotensinógeno, la cual consiste en una substitución del aminoácido metionina por una treonina en la posición 174 de la proteína.

b) Definición operacional: El alelo M235 identificado por una banda fluorescente de 266 pb en vez de una de 303 pb en un gel de agarosa.

c) Tipo de variable: cualitativa

d) Escala de medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de medición: si/no

### **VARIABLE DEPENDIENTE:**

#### **1. Enfermedad vascular cerebral isquémica.**

a). Definición conceptual. Presencia de un déficit neurológico clínico asociado a la evidencia de una zona isquémica en el sistema nervioso central observada en la tomografía axial computarizada o resonancia magnética nuclear del encéfalo.

b). Definición operacional. Presencia de una zona de hipointensidad que representa necrosis en cualquier área del sistema nervioso central en un estudio de imagen (TAC, RM).

c ). Tipo de variable. Cualitativa.

d). Escala de medición. Nominal, dicotómica.

e) Unidades de medición: si/no

## **VARIABLES CONFUSORAS:**

### **1.- Hipertensión arterial sistémica**

a) Definición Conceptual: Elevación de la tensión arterial sistólica >de 140 mmHg o de la tensión arterial diastólica >90 mmHg en mediciones repetidas, o bien cifras de tensión, arterial normal, pero bajo tratamiento antihipertensivo.

b) Definición Operacional: Diagnóstico previo de hipertensión arterial. TA sistólica  $\geq 140$  mmHg o diastólica  $\geq 90$  mmHg durante la revisión en mediciones repetidas o bien cifras de tensión arterial normales pero bajo el efecto de tratamiento antihipertensivo.

c) Tipo de variable: cualitativa

d) Escala de medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de medición: si/no

### **2.- Diabetes Mellitus**

a) Definición conceptual: Elevación de la glucosa sérica  $\geq 126$  mg/dL en ayuno de al menos 6 horas, o bien 200 mg/dL o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas.

b) Definición operacional: Diagnóstico previo o durante la revisión de cifras de glicemia  $\geq 126$  mg/dL en ayuno de al menos 6 horas. 200 mg/dL o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas o bien cifras normales de glucemia bajo tratamiento hipoglucemiante.



- c) Tipo de variable: cualitativa
- d) Escala de medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de medición: si/no

### **3.- Dislipidemia**

- a) Definición conceptual: Estado de desequilibrio entre el aporte y la demanda de grasas que condiciona elevación de colesterol y ácidos grasos.
- b) Definición operacional: Colesterol igual ó mayor a 220 mg/dl y cifra de triglicéridos  $\geq 180$  mg/dl.
- c) Tipo de variable: cualitativa
- d) Escala de medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de medición: si/no

### **4.- Tabaquismo**

- a) Definición conceptual: Consumo de tabaco en cualquier época de la vida de por lo menos un cigarrillo por día durante un año, o bien la exposición pasiva al humo de tabaco diariamente al menos de un año.
- b) Definición operacional: Antecedente de consumo de tabaco en cualquier época de la vida de por lo menos un cigarrillo por día durante un año, o bien la exposición pasiva diaria al humo de tabaco en un año.
- c) Tipo de variable: cualitativa
- d) Escala de medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de medición: si/no

### **5.- Obesidad**

- a) Definición conceptual: Peso corporal de al menos 2 DS por arriba de la media para edad y sexo, secundario al acúmulo de tejido adiposo.
- b) Definición operacional: Individuo con IMC  $>30/m^2$  de superficie corporal.

- c) Tipo de variable: cualitativa
- d) Escala de medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de medición: si/no

## **6.- Edad**

- a) Definición conceptual: Número de años que tiene el paciente desde que nace hasta el momento de ingresar al estudio.
- b) Definición operacional: Número de años reportado por el paciente corroborado por información del expediente.
- c) Tipo de variable: Covariable
- d) Escala de medición: Cuantitativa continua
- e) Unidades de medición o categorías: Años.

## **7.- Sexo**

- a) Definición conceptual: Género que tiene el paciente de acuerdo a sus características fenotípicas.
- b) Definición operacional: Género que tiene el paciente de acuerdo a registros y evaluación clínica.
- c) Tipo de variable: Covariable.
- d) Escala de medición: Cualitativa nominal.
- e) Unidades de medición o categorías: Femenino o masculino.

## **6) Descripcion general del estudio**

**Extracción de la muestra sanguínea:** Para obtener el ADN se extrajo de la vena antecubital 15 ml de sangre total (teniendo cuidado de que el torniquete no se aplique con mucha tensión), colectada en un tubo conteniendo EDTA (4 ml) y se centrifugó a 2500 g por 10 minutos. La capa superior (plasma) se retiró

cuidadosamente tratando de no perturbar la siguiente capa en donde se encuentran localizados los leucocitos (*buffy coat*) y se transfirió con una pipeta de plástico estéril a un tubo de plástico Eppendorf estéril de 1.5 ml libre enzimas (RNAsas y DNAsas). El concentrado eritrocitario de la capa inferior se desechó en un contenedor destinado para material orgánico (residuos peligrosos). Finalmente se utilizó un tubo sin anticoagulante (7ml) para obtener suero, el cual se utilizó para determinación de niveles de ECA y de angiotensinógeno.

**Extracción de ADN:** Se utilizó el equipo comercialmente disponible de la marca Qiagen (QIAamp DNAMini Kit) de acuerdo a las instrucciones establecidas por la compañía. Una vez extraído el ADN se procedió a su conservación en un congelador a -70° C, hasta que se utilizó para la amplificación de los segmentos correspondientes.

**Genotipificación de la inserción/delección en el gen de la ECA:** Después de la extracción de ADN se procedió a la amplificación del fragmento de interés mediante el uso de la técnica de biología molecular de reacción en cadena de la polimerasa para polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PCR) con los siguientes oligonucleótidos: (sentido) 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' y (antisentido) 5'GAT GTG GCC ATC TTC GTC AGA T-3' en un volumen final de 50 microlitros conteniendo 3 mM (milimolar) de cloruro de Mg, 50 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl (pH 8.4) 0.5 mM de cada dNTP (dideoxinucleótidos): dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Promega) y 1 unidad de Taq-polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Applied Biosystem bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 58°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min y repetidos por 30 ciclos. Los productos de PCR se separaron mediante un gel de agarosa al 3% mediante bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz UV. La interpretación se basó en el reconocimiento de las bandas de 190 y 490 pares de bases para la delección (D) e inserción (I) respectivamente.

### **Genotipificación del polimorfismo M235T en el gen del angiotensinógeno:**

Después de la extracción de ADN se procedió a la amplificación del fragmento de interés mediante el uso de la técnica de biología molecular PCR-RFLP con los siguientes oligonucleótidos:

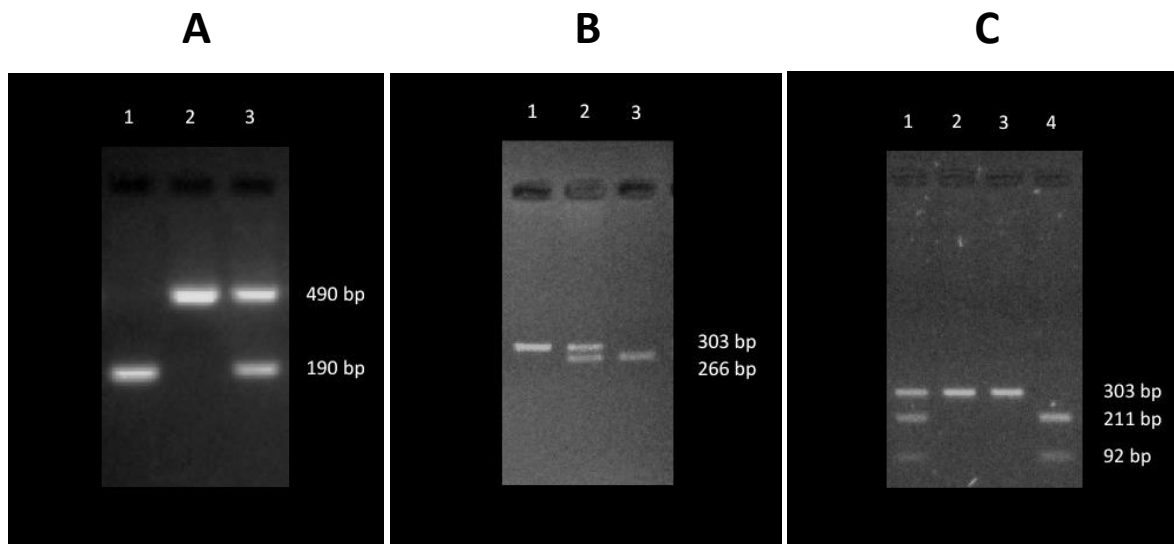
Sentido: 5'-GATGCGCACAAGGTCCTG3' y antisentido: 5' CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC3' en un volumen final de 50 microlitros conteniendo 3 mM de Cloruro de Mg, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 0.5 mM de cada dNTP (Promega) y 1 unidad de Taq polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Applied Biosystem bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización a 94°C por 1 min. alineación a 61°C por 1 min. y extensión a 72°C por 2 min. y repetidos por 25 ciclos. Una extensión final de 15 min. a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a restricción por la acción de la enzima *SfaNI*. El alelo M235 se identificó mediante la banda de 266 pb y el alelo T no se seccionó por la acción de la enzima permaneciendo un producto de PCR de 303 pb en un gel de agarosa al 3% utilizando bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV.

### **Genotipificación del polimorfismo T174M en el gen del angiotensinógeno:**

Después de la extracción de ADN se procedió a la amplificación del fragmento de interés mediante el uso de la técnica de biología molecular PCR-RFLP con los siguientes oligonucleótidos: (sentido) 5'-GATGCGCACAAGGTCCTG3' y (antisentido) 5' CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC3' en un volumen final de 50 microlitros conteniendo 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 0.5 mM de cada dNTP (Promega) and 1 unidad de Taq polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca *Applied Biosystem* bajo las siguientes condiciones térmicas desnaturalización a 94°C por 1 min. alineación a 61°C por 1 min. y extensión a 72°C por 2 min. repetidos por 25 ciclos. Una extensión final de 15 min. a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a restricción por la acción de la enzima *NcoI*. El alelo T134M se identificó mediante la banda de 211 pb y 92 pb, mientras que el alelo T no se seccionó por la acción de la enzima

permaneciendo un producto de PCR de 303 pb en un gel de agarosa al 3% utilizando bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV.

**Figura 1.** Geles de agarosa con bandas fluorescentes para la identificación de los polimorfismos de interés. Imagen representativa.



(A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. La línea 1 representa el homocigoto D/D, la línea 2 representa el homocigoto I/I, la línea 3 representa el heterocigoto I/D. (B) Análisis de gel de agarosa de la región polimórfica M235T del gen del angiotensinógeno. La línea 1 representa el fragmento polimórfico M/M, la línea 2 el fragmento correspondiente al genotipo T/M después de la digestión con *Sfa*NI (235pb), y la línea 3 representa el genotipo T/T. (C) Análisis electroforético en gel de agarosa de la región polimórfica T174M del gen del angiotensinógeno. La línea 1 representa el fragmento correspondiente al genotipo M/T posterior a la digestión con *Nco*I, la línea 2 y 3 representan el genotipo silvestre M/M y la línea 4 el genotipo polimórfico T/T.

## 7) Análisis estadístico

Los datos se presentan como medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo a la distribución de los datos. Se calculó el riesgo relativo con intervalos de confianza (IC) del 95% para las variables independientes. Las variables categóricas se analizaron con la prueba de chi cuadrada. Para el análisis de variables continuas se usó la prueba de t de Student. Para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó la prueba de chi cuadrada. Se consideró con significancia estadística un valor de  $p \leq 0.05$ . Arriba de 1 se consideró de riesgo.

Finalmente, todas las variables en las que se haya obtenido una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) se incluyeron en un análisis multivariado de

regresión logística para obtener cada uno de los factores que representaron un riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 18: SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Las diferencias en los niveles plasmáticos de ECA y angiotensinógeno entre los tres diferentes genotipos se evaluaron mediante la prueba de ANOVA.

## VII. ASPECTOS ÉTICOS

**Riesgo de la Investigación.** Esta investigación se consideró de riesgo mínimo de acuerdo a la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la salud en seres humanos, título segundo, capítulo I, artículo 17, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1987.

**Apego a normativas y tratados.** El presente proyecto se ajusta a los preceptos enunciados en la declaración de Helsinki y sus revisiones así como a lo estipulado en la Ley General de Salud en cuanto a la investigación médica en sujetos humanos.

**Consentimiento informado.** Se elaboró un instructivo en donde se especificó en lenguaje claro y sencillo los objetivos del proyecto, los beneficios y riesgos esperados y la manera en que participaron los pacientes, haciendo hincapié que en caso de solicitar retirarse del estudio, no influiría en su atención médica. Al final del instructivo se incluyó la carta de consentimiento bajo información que corresponde a un resumen de lo anotado en el instructivo, también en lenguaje claro y sencillo, además de un espacio en donde el paciente aceptó participar en el proyecto, anotándose nombre y firma (huella digital) del paciente, de dos testigos y del investigador responsable local.

**Potenciales beneficios.** No existe un beneficio directo para el paciente mas que la realización de un protocolo de estudio completo, la identificación de trombofilias y de los polimorfismos.

**Potenciales riesgos.** Se catalogó como de riesgo mínimo ya que se tomó una muestra biológica (sangre) que es adicional al estudio habitual que se realiza a los pacientes.

**Balance riesgo-beneficio.** No hay un riesgo mayor al participar en la investigación.

**Confidencialidad de la información.** Se le asignó a cada paciente un numero, el cual se utilizó para la identificación del sujeto durante el desarrollo del estudio. Los datos personales se mantuvieron en una base de datos al que sólo tuvieron acceso

los investigadores principales, con lo cual se garantizó la confidencialidad de la información.

**Selección de los potenciales participantes.** Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a como se captaron en las diferentes sedes colaboradoras, sin preferencia de ningún tipo, siempre que cumplieran con los criterios de inclusión.



## VIII. RESULTADOS

El número de casos fue de 224 al igual que de controles. Las características generales de los pacientes y controles se muestran en la Tabla 1. Todos los participantes tienen ancestría mexicana (al menos dos generaciones previas nacidas en México). La edad de los pacientes fue de 45 años o menor. La media de edad para el grupo de pacientes fue de  $33.71 \pm 4.6$  mientras que en el grupo control fue de  $32.2 \pm 6.5$  años. No hubo diferencia respecto a género entre ambos grupos ( $p = 0.65$ ). Se realizó tamizaje de trombofilia sólo en los pacientes. Los casos tuvieron mayor prevalencia de factores tradicionales de riesgo cardiovascular para enfermedad vascular cerebral. Se observó mayor frecuencia de hipertensión en el grupo de pacientes (15.6% vs. 4.9%; OR = 2.78; IC 95% = 1.39-5.61;  $p = 0.001$ ), tabaquismo (32.1% vs. 16.9%; OR = 2.05; IC 95% = 1.30-3.26;  $p = 0.001$ ) y antecedente familiar de enfermedad cardiovascular (25.9 vs. 20,5%; OR = 1.82; IC 95% 1.12 -2.98;  $p = 0.01$ ). No se encontró diferencia significativa en cuanto a dislipidemia ( $p = 0.5$ ) o diabetes ( $p = 0.32$ ) entre los grupos.

**Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con enfermedad isquémica idiopática y sus controles.**

	Pacientes (n=224)	Controles (n=224)	Valor de $P^*$
Edad, años (promedio, SD)	$33.7 \pm 4.6$	$32.2 \pm 6.5$	0.65
Mujer, n (%)	136 (60.7)	136(60.7)	NS
Hombre, n (%)	88 (39.3)	88 (39.3)	0.50
Diabetes Mellitus, n (%)	21 (9.4)	16 (7.1)	0.32
Hipertensión, n (%)	35 (15.6)	14 (4.9)	0.001
Tabaquismo actual , n (%)	72 (32.1)	42 (16.9)	0.001
Dislipidemia, n (%)	104 (46.4)	97 (43.3)	0.001
Historia familiar de <b>ATD</b> , n (%)	58 (25.9)	36 (20.5)	0.01

\*Valor de P: Prueba de t para variables continuas, Chi cuadrada o prueba exacta de Fischer para proporciones. EVC= Enfermedad vascular cerebral; NS= No significativa

La Tabla 2 muestra la distribución de genotipos y alelos I/D en el gen de la ECA para los pacientes y controles. No hubo diferencia significativa en la distribución entre ambos grupos ( $p = 0.20$ ). La proporción de genotipos en el grupo de pacientes fue de 79 individuos (35.3%) homocigotos para el alelo I, 106 (47.3%) heterocigotos I/D y 39 (17.4%) homocigotos para el alelo D. No se encontró diferencia significativa en la frecuencia alélica ( $p = 0.20$ ). En el grupo de pacientes y controles la frecuencia del alelo D fue de 41.0% y 36.8%, respectivamente. El análisis univariado no mostró diferencia en la distribución genotípica entre pacientes con infarto cerebral y controles (portadores I/I e I/D), comparado con el genotipo D/D (OR = 1.23; IC 95% = 0.83-1.84;  $p = 0.28$ ).

**Tabla 2. Genotipo I/D y frecuencia alélica en pacientes con enfermedad vascular cerebral isquémica y controles.**

Genotipo I/D	Pacientes (n=224)	Controles (n=224)	Valor de P*
<b>Genotipo</b>			
I/I, n (%)	79 (35.3)	90 (40.2)	
I/D, n (%)	106 (47.3)	103 (46.0)	
D/D, n (%)	39 (17.4)	31 (13.8)	0.20*
D/D+I/D vs I/I	39+106 vs. 79	31+103 vs. 90	0.28*
<b>Alelo</b>			
I, n (%)	264 (59.0)	283 (63.2)	
D, n (%)	184 (41.0)	165 (36.8)	0.20*

Los datos presentados se refieren al número de pacientes (%). \*  $\chi^2$

La Tabla 3 muestra la distribución de genotipos y alelos del polimorfismo M235T en el gen de la AGT en pacientes y controles. Hubo diferencia significativa en la distribución de los genotipos entre ambos grupos ( $p = 0.001$ ). La distribución

genotípica en el grupo control fue de 134 individuos (60%) homocigotos para el alelo M, 65 (29%) heterocigotos M/T, y 25 (11%) homocigotos para el alelo T. Se observó diferencia significativa en la frecuencia alélica ( $p = 0.01$ ). En pacientes y controles, las frecuencias para el alelo T fueron 26.5% y 18.3%, respectivamente.

**Tabla 3. Genotipo M235T y frecuencia alélica en pacientes con enfermedad vascular cerebral isquémica idiopática y controles.**

	Pacientes (n=224)	Controles (n=224)	Valor de $P^*$ ( )
<b>Genotipo</b>			
M/M, n (%)	134 (60.0)	153 (68.3)	
M/T, n (%)	65 (29.0)	60 (26.8)	
T/T, n (%)	25 (11.0)	11 (4.9)	0.01*
T/T +M/M vs. M/T	25 +65 vs. 134	11+60 vs. 153	0.01*
<b>Alelo</b>			
M, n (%)	333 (74.5)	366 (81.7)	
T, n (%)	115 (26.5)	82 (18.3)	0.01*

Los datos presentados se refieren al número de pacientes (%). \*  $\chi^2$

En la Tabla 4 se muestra la distribución alélica y genotípica del polimorfismo T174M para pacientes y controles. Hubo diferencia significativa en la distribución de genotipos entre ambos grupos ( $p = 0.02$ ). En el grupo control, los genotipos

encontrados fueron 166 (74.1%) individuos homocigotos para el alelo M, 54 (24.1%) heterocigotos M/T y 4 (1.8%) homocigotos para el alelo T. Se evidenció diferencia significativa en la frecuencia alélica ( $p = 0.02$ ). Para pacientes y controles, las frecuencias del alelo M fueron 13.8% y 9.0%, respectivamente.

**Tabla 4. Genotipo T174M y frecuencia alélica en pacientes con enfermedad vascular cerebral isquémica idiopática y controles.**

	Pacientes (n=224)	Controles (n=224)	Valor de $P^*$
<b>Genotipo</b>	<b>VALORES AL REVÉS</b>	<b>CON ÉSTOS</b>	
T/T, n (%)	185 (82.5)	166 (74.1)	
T/M, n (%)	54 (24.1)	38 (17.0)	
M/M, n (%)	4 (1.8)	1 (0.5)	0.03*
M/M + TM vs. TT	4+54 vs. 166	1+38 vs. 185	0.03*
<b>Alelo</b>			
T, n (%)	386 (86.2)	408 (91.0)	
M, n (%)	62 (13.8)	40 (9.0)	0.02*

Los datos presentados se refieren al número de pacientes (%). \*  $\chi^2$

En la Tabla 5 se muestra el análisis de OR ajustados, 4 factores de riesgo independientes se asociaron con EVC isquémico (EVCi): alelos T235 y M174; tabaquismo; hipertensión y antecedente familiar de enfermedad vascular cerebral.

**Tabla 5. Análisis de regresión logística múltiple utilizando EVC isquémico como variable dependiente.**

Factor de riesgo	OR	95% CI	Valor de P
M235T	2.1	(1.0-3.2)	0.01
T174M	1.2	(1.0-2.4)	0.03
Hipertensión	2.7	(1.04-3.7)	0.03
Tabaquismo	2.5	(1.1-4.0)	0.02
Historia familiar de EVC	1.6	(1.0-2.42)	0.04

OR: razón de momios; EVC = Enfermedad vascular cerebral.

En la Tabla 6 se muestran las frecuencias alélicas y los alelos de riesgo de los poliformismos entre diferentes grupos étnicos.

**Tabla 6. Frecuencia alélica de los alelos de riesgo de los polimorfismos entre los diferentes grupos étnicos.**

<b>Alelo</b>	<b>Autor</b>	<b>Grupo étnico</b>	<b>Tamaño de muestra</b>	<b>Edad promedio</b>	<b>Frecuencia alélica</b>
<b>I/D del gen ACE</b>	Isordia y cols. (actual)	Mexicano	224	37.7	41.0%
	Pera y cols. (2006) <sup>118</sup>	Polaco	368	65.1	52.2%
	Tuncer y cols. (2006) <sup>117</sup>	Turco	108	70.9	64.0%
	Karagiannisy cols. (2004) <sup>119</sup>	Griego	100	69.3	57.0%
	Dominguez y cols. (2010) <sup>120</sup>	Español	531	71.5	65.4%
	Markoula y cols. (2011)	Griego	176	65.9	59.1%
	Mostafa y cols. (2016)	Egipcio	30	61.1	10.0%
	<b>M235T del gen AGT</b>	Isordia y cols. (actual)	Mexicano	224	37.7
Saidi y cols. (2009)		Tunesino	202	60.3	40.2%
Nakase y cols. (2007)		Japonés	78	70.2	83.0%
Um y cols. (2005)		Coreano	365	66.1	88.0
<b>T174M del gen AGT</b>	Isordia y cols. (actual)	Mexicano	224	37.7	13.8%
	Saidi y cols. (2009)	Tunesino	202	60.3	12.0%
	Liu y cols. (2004)	Chino	90	58.4	87.7%

En nuestro estudio las concentraciones de AGT fueron mayores comparadas con el grupo control ( $p = 0.001$ ). Sin embargo, los niveles fueron similares en los 3 genotipos M235T.

## IX. DISCUSIÓN

La EVC isquémica constituye una enfermedad compleja y heterogénea de múltiples etiologías con manifestaciones clínicas relevantes. Mientras los factores de riesgo tradicionales como diabetes, tabaquismo, hipertensión y dislipidemia son considerados más importantes que los factores hereditarios, diversos estudios de casos y controles y metaanálisis han demostrado una fuerte contribución de factores y antecedentes genéticos que influyen en la susceptibilidad a EVCI.

La ECA, enzima clave en el sistema renina-angiotensina, media la homeostasis de la pared vascular y el volumen extracelular. Cataliza la conversión del decapeptido angiotensina I en el octapéptido angiotensina II. El polimorfismo de Inserción/Delección (I/D) en la región no codificante del gen de la ECA ha sido asociado significativamente con IC en diferentes poblaciones,<sup>(97)</sup> mientras que otros estudios no han logrado demostrar dicha asociación.<sup>(117,118)</sup> La ECA activa la angiotensina I e inactiva bradicinina, ocasionando menor perfusión tisular, hipertrofia de las células musculares lisas de la vasculatura y estimulación del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. Además, las concentraciones plasmáticas de ECA constituyen un factor importante en el perfil de riesgo cardiovascular y cerebrovascular, ya que la exposición crónica a niveles plasmáticos elevados de ECA puede resultar en engrosamiento y rigidez de la pared vascular.

Los resultados de estudios previos del polimorfismo I/D en EVC han sido inconsistentes, algunos grupos reportan asociación entre el genotipo DD y/o el alelo D y el desarrollo de EVCI, mientras que otros reportan lo contrario.

En el presente estudio se investigó la posible asociación entre el polimorfismo I/D en el gen del ECA e I EVCI en nuestro grupo de pacientes. Los hallazgos son consistentes con los publicados por Pera et al, en la población Polaca.<sup>(118)</sup> Sin embargo, ellos encontraron un mayor porcentaje del genotipo DD en el grupo de pacientes (23.9%) comparado con el nuestro (17.4%).

Tuncer et al, demostraron ausencia de asociación del genotipo DD y/o del alelo D con EVCI o sus subtipos en la población de Turquía<sup>(117)</sup>. Resultados similares se

obtuvieron por Karaginannis y cols.<sup>(119)</sup> en población griega. Otro resultado negativo fue observado por Dominguez y cols.<sup>(120)</sup> en la población española.

Se ha demostrado que la actividad enzimática se encuentra asociada con el polimorfismo I/D, siendo mayor en los sujetos con genotipo DD, baja para los sujetos II, y de nivel intermedio en los heterocigotos.<sup>(80)</sup> Esto fue confirmado por Domingues y cols., quien además analizó los niveles circulantes de la proteína ECA y confirmó que el genotipo DD se asoció con mayores niveles de la proteína, aunque los pacientes con IC no presentaron niveles más elevados de ECA comparado con los controles.<sup>(120)</sup> Además, otros estudios han descrito niveles incrementados de ECA basales en pacientes con EVCI.<sup>(96)</sup> Una de las limitaciones de nuestro estudio radica en la falta de medición de la actividad de la ECA y su correlación con los genotipos estudiados.

En contraste, Markoula y cols.<sup>(121)</sup> evaluaron la asociación de I/D en el gen de la ECA con el desarrollo de EVCI, los subtipos de ésta y el género de los pacientes. Concluyen que el polimorfismo I/D puede jugar un papel en la presentación de la enfermedad, respecto al género, con un posible efecto del genotipo II en mujeres. Otro metaanálisis demostró en el análisis por subgrupos, que el riesgo para el genotipo D/D era más pronunciado entre asiáticos y enfermedad de vaso pequeño.<sup>(97)</sup>

Sin embargo, Mostafa et al, mostraron que el polimorfismo I/D estaba asociado a EVCI en pacientes de Egipto, pero no era específico para la enfermedad de vaso grande o pequeño.<sup>(122)</sup> En nuestro estudio, alrededor del 80% de los pacientes tenían enfermedad de grandes vasos.

Los resultados controversiales entre diferentes grupos étnicos pueden atribuirse a la discrepancia en la distribución de frecuencias del polimorfismo I/D. Otros factores como el sesgo de selección y los diferentes criterios de emparejamiento también pueden influir. Además, la interacción gen-gen y gen-ambiente deberá considerarse en estudios futuros, lo cual permitirá un mejor entendimiento de la asociación entre el polimorfismo I/D del gen de la ECA y el riesgo de EVC.



El sistema renina-angiotensina comprende una cascada de reacciones enzimáticas, resultando en la producción de angiotensina II (ATII) a partir del sustrato angiotensinógeno (AGT). La renina hidroliza el AGT en angiotensina 1 (AT1), la cual es posteriormente convertida en el octapéptido bioactivo ATII a través de la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La mayoría de los estudios acerca de angiotensinógeno se han enfocado en 2 variantes genéticas en el exón 2 del gen del AGT que originan la sustitución de un aminoácido de metionina por una treonina en la posición 235 (M235T), y la sustitución de una treonina por una metionina en el sitio 174 (T174M).

Recientemente, algunos estudios han demostrado que el polimorfismo del AGT M235T se asocia con IC en diferentes poblaciones.<sup>(97,123)</sup> Nuestros resultados mostraron una asociación significativa del M235T con un incremento del riesgo dos veces mayor para el desarrollo de EVCI. Dichos resultados son acordes a los publicados por Saidi et al, quienes encontraron el M235T asociado con mayor riesgo de EVCI.<sup>(124)</sup> A su vez, Nakase observó que dicho polimorfismo representa un riesgo para infarto lacunar en hombres japoneses, independientemente del antecedente de hipertensión.<sup>(109)</sup>

En un metaanálisis de 21 estudios se evaluó la asociación entre el polimorfismo M235T del angiotensinógeno y el riesgo de EVCI. Los resultados indicaron que el polimorfismo era un factor de riesgo para EVCI. En el análisis estratificado por grupo humano, el polimorfismo M235T estuvo asociado significativamente con EVCI en asiáticos. Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre el polimorfismo y EVCI en población caucásica. En cuanto al subgrupo de edad, se encontró también que el polimorfismo podía incrementar el riesgo de EVCI tanto en forma temprana como tardía.<sup>(125)</sup>

Otro metaanálisis realizado por Wang et al, incluyó 6 principales estudios comprendiendo 891 pacientes con EVCI y 727 controles. Los resultados mostraron que hubo asociación significativa entre el polimorfismo M235T del gen del AGT y el riesgo de EVCI en la población de Asia del Este.<sup>(126)</sup> También se ha relacionado con mayores tasas de mortalidad asociada a IC en Asia.<sup>(127)</sup>

Um et al obtuvieron resultados similares en población coreana. Encontraron que el genotipo TT del AGT incrementó el riesgo relativo para EVCI (OR = 1.7), y la combinación del genotipo TT y el genotipo DD de la ECA aumentaba aún más el riesgo relativo para IC (OR = 1.9). La media de edad para dichos pacientes fue de 70 años.<sup>(128)</sup> Sin embargo, no hubo asociación positiva entre M235T de AGT y EVCI en población caucásica. Únicamente 6 estudios no relacionados se incluyeron en el metaanálisis, lo cual podría haber dado lugar a los resultados negativos.<sup>(129)</sup>

Las diferencias étnicas pueden explicar las discrepancias observadas en la asociación con EVCI, evidenciado por la amplia variabilidad en la distribución alélica del 235T entre los diferentes grupos bioétnicos; la población asiática, incluyendo japoneses, muestra mayor frecuencia (60-80%) mientras que los occidentales exhiben una menor frecuencia (35-45%) del alelo T del AGT.

Además, se ha asociado el genotipo 235T con niveles más elevados de AGT.<sup>(130)</sup> En un estudio previo de casos y controles de 301 hombres caucásicos realizado en el Frankfurt University Medical Center, los niveles plasmáticos de AGT se incrementaron de forma escalonada de acuerdo al número de alelos T235 presentes.<sup>(130)</sup>

Recientemente diversos estudios se han enfocado en la asociación entre el polimorfismo T174M del AGT y EVCI. No obstante, las asociaciones observadas en dichos estudios no han sido concluyentes. En el presente estudio, el polimorfismo T174M se asoció a EVCI para esta variable. Encontramos diferencia estadística significativa en la distribución genotípica ( $p = 0.02$ ) y alélica ( $p = 0.02$ ). Nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por Saidi et al en población de Túnez.<sup>(124)</sup>

En un metaanálisis realizado por Ou et al, se incluyeron 6 estudios con 1290 casos de EVC isquémico y 1125 controles. No se encontró asociación significativa entre el polimorfismo M174T y EVCI. Empero, en el análisis por subgrupos basado en bioetnia, los resultados confirmaron asociación significativa entre el polimorfismo T174M de AGT e IC en población Asiática.<sup>(131)</sup>

En el metaanálisis de Wang et al, se demostró asociación positiva entre el polimorfismo T174M en el gen del AGT y el riesgo de enfermedad arterial coronaria.<sup>(111)</sup> En contraste, Liu et al, encontraron asociación significativa entre el polimorfismo M235T y EVCI, pero el T174M no se asoció con dicha patología en el mismo grupo de pacientes.<sup>(132)</sup>

El mecanismo por el cual el polimorfismo T174M del gen de AGT se relaciona con riesgo de EVCI no está claro. Sin embargo se ha postulado que los individuos con el alelo 174T tienen niveles más elevados de angiotensinógeno comparados con aquellos con 174M. En nuestro estudio obtuvimos diferencia en la concentración de AGT entre el grupo de pacientes con EVCI y controles. A pesar de eso, no encontramos ninguna asociación entre niveles elevados de AGT y el alelo T. Estos resultados concuerdan con los publicados por Rotimi et al, en sujetos nigerianos hipertensos.<sup>(133)</sup> Ellos tampoco pudieron relacionar los niveles de la proteína en pacientes con uno u otro alelo.

Múltiples investigaciones han revelado que la angiotensina II (ATII) contribuye a los cambios ateroscleróticos y ruptura de la placa a través de diversos mecanismos como vasoconstricción, hipertrofia de células musculares lisas vasculares, trombogénesis y antifibrinólisis.

Como ha sido demostrado por estudios de asociación, los factores genéticos son particularmente importantes en la predisposición a EVCI. La identificación de variantes genéticas en el riesgo de EVCI idiopática es esencial para la predicción de riesgo, prevención y tratamiento.

También hemos descrito la asociación entre el alelo T del polimorfismo C677T<sup>(63)</sup> y el alelo Asp del Glu298Asp y el riesgo de IC en el mismo grupo de pacientes jóvenes con EVCI.<sup>(65)</sup> Es importante mencionar que los pacientes de nuestro grupo fueron menores de 45 años de edad y la media fue de 33.7 años, representando uno de los pocos estudios publicados en individuos jóvenes.

Así como lo descrito en otros estudios en población joven, hipertensión y tabaquismo se asociaron con EVCI, persistiendo como factores de riesgo

independientes después del ajuste de otras variables. Diabetes mellitus y dislipidemia no se relacionaron con EVCI en nuestra población, dichos resultados son semejantes a los descritos previamente.<sup>(27)</sup> En contraste, los estudios realizados en población de mayor edad con EVCI han encontrado que diabetes mellitus y dislipidemia representan factores de riesgo para EVCI.<sup>(27)</sup> Basado en estos hechos, consideramos que los factores de riesgo aterotrombótico pueden no tener la misma influencia en EVCI en pacientes jóvenes comparados con individuos de mayor edad, y que la interacción entre esos factores y variantes genéticas específicas difiere para cada grupo de edad.<sup>(54)</sup>

En conclusión, encontramos que los polimorfismos M235T y T47M representan un mayor riesgo para EVCI en este grupo de pacientes. No obstante, el polimorfismo I/D no se asoció con EVCI en este mismo grupo de estudio. Los niveles de angiotensinógeno fueron más elevados en el grupo de pacientes afectados comparado con los controles. Aunque la concentración de la proteína fue similar entre los 3 genotipos del polimorfismo M235T y T174M.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Smith WS, English JD, Johnston SC. Cerebrovascular diseases. En: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Larry Jameson J, Loscalzo J, eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 2513-2536.
- 2.- Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Chang AR, et al. Stroke (cerebrovascular disease) Heart disease and stroke statistics. 2018 update. Circulation. 2018;137:e67-e493.
- 3.- Smajlovic D. Strokes in young adults. Epidemiology and prevention. Vasc Health Risk Manag. 2015;11:157-164.
- 4.- Terry AR, Jordan JT, Schwamm L, Plotkin SR. Increased risk of cerebrovascular disease among patients with neurofibromatosis type 1. Stroke. 2016;47:60-75.
- 5.- Stack CA, Cole JW. A diagnostic approach to stroke in young adults. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2017;25:19-84.
- 6.- [http://www.who.int/topics/cerebrovascular\\_accident/en/](http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/)
- 7.- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2015;131:e29-322.
- 8.- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, y cols., American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association, Circulation. 2010;121:948-954.
- 9.- Durai PJ, Padma V, Vijaya P, Sylaja PN, Murthy JM. Stroke and thrombolysis in developing countries. Int J Stroke. 2007;2:17-26.
- 10.- Bonita R, Mendis S, Truelsen T, Bogousslavsky J, Toole J, Yatsu F: The global stroke initiative. Lancet Neurol. 2004;3:391-393.
- 11.- Frenk Mora J, et al. Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. México: Secretaria de Salud, SSA; 2001. p. 21-33.

- 12.- Consejo Nacional de Población, CONAPO. Proyecciones de la Población de México por entidades federativas 2010–2030. México: Secretaría de Gobernación, SEGOB; 2013. [http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones\\_Datos](http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones_Datos).
- 13.- INEGI, I.N.d.E.y.G. Estadísticas a propósito del Día de Muertos. Aguascalientes: Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2013.
- 14.- [http://www.who.int/nmh/countries/mex\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/nmh/countries/mex_en.pdf?ua=1)
- 15.- <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- 16.- Cantú BC, Ruiz SJ, Chiquete E, Arauz A, León JC, Murillo BLM, et al. Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México. Estudio RENAMEVASC. Rev Mex Neuroci. 2011;12:224-234.
- 17.- <https://www.populationpyramid.net/es/m%C3%A9xico/2018/>
- 18.-Wong KS, Caplan LR, Kim JS. Stroke mechanisms. Front Neurol Neurosci. 2016;1;40:58-71.
- 19.- McArdle PF, Kittner SJ, Ay H, Brown RD Jr, Meschia JF, Rundek T, et al. Agreement between TOAST and CCS ischemic stroke classification: the NINDS SiGN study. Neurology. 2014;83:1653-1660.
- 20.- Desai JA, Abuzinadah AR, Imoukhuede O, Bernbaum M, Modi J, Demchuk AM, Coutts SB. Etiologic classification of TIA and minor stroke by A-S-C-O and Causative Classification System as compared to TOAST reduces the proportion of patients categorized as cause undetermined. Cerebrovasc Dis. 2014;38:121-126.
- 21.- Gökçal E, Niftaliyev E, Asil T. Etiological classification of ischemic stroke in Young patients: a comparative study of TOAST, CCS and ASCO. Acta Neurol Belg. 2017;117:643-648.
- 22.- Chung JW, Park SH, Kim N, Kim WJ, Park JH, Ko Y, Yang MH, Jang MS, Han MK, Jung C, Kim JH, Oh CW, Bae HJ. Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment (TOAST) classification and vascular territory of ischemic stroke lesions diagnosed by diffusion-weighted imaging. J Am Heart Assoc. 2014;3:1-8.
- 23.- Amort M, Fluri F, Weisskopf F, Gensicke H, Bonati LH, Lyrer PA, Engelter ST. Etiological classification of transient ischemic attacks: subtype classification by TOAST, CCS and ASCO. A pilot study. Cerebrovasc Dis. 2012;33:508-516.

- 24.- McArdle PF, Kittner SJ, Ay H, Brown RD Jr, Meschia JF, Rundek T, et al. Agreement between TOAST and CCS ischemic stroke classification: the NINDS SiGN study. *Neurology*. 2014;83:1653-1660.
- 25.- Wei W, Li S, San F, Zhang S, Shen Q, Guo J, Zhang L. Retrospective analysis of prognosis and risk of patients with stroke by TOAST). *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:1-6.
- 26.- Adams HP, Bendien BH, Kappelle LH, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh E et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke*. 1993;24:35-41.
- 27.- Putaala J, Metso AJ, Metso TM, Konkola N, Kraemer Y, Haapaniemi E, Kaste M, Tatlisumak T. Analysis of 1008 consecutive patients aged 15 to 49 with first-ever ischemic stroke. The Helsinki Young Stroke Registry. *Stroke*. 2009;40:1195-1203.
- 28.- Kefi A, Larbi T, Abdallah M, El Ouni A, Bougacha N, Bouzlama K, Hamzaoui S, M´rad S. Young ischemic stroke in Tunisia: a multicentric study. *Int J Neurosci*. 2017;127:314-319.
- 29.- Sen S, Dahlberg K, Case A, Paolini S, Burdine J, Peddareddygar LR, Grewal RP. Racial-ethnic differences in stroke risk factors and subtypes: results of a prospective hospital-based registry. *Int J Neurosci*. 2013;123:568-374.
- 30.- Torrealba G, Carazo K, Chiou SH, OBrien AT, Fernández H. Epidemiology of stroke in Costa Rica: A 7 year hospital-based acute stroke registry of 1319 consecutive patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27:1143-1152
- 31- Spengos k, Vemmos K. Risk factors, etiology and outcome of first-ever ischemic stroke in Young adults aged 15 to 45- The Athens Young stroke registry. *Eur J Neurol*. 2010;17:1358-1364.
- 32.- Wolf ME, Grittner U, Böttcher T, Norving B, Rolfs A, Hennerici MG. Phenotypic ASCO characterisation of Young patients with ischemic stroke in the prospective Multicentre Observational sifap 1 Study. *Cerebrovasc Dis*. 2015;40:129-135.
- 33.-Ferro MJ, Massaro AR, Mas JL. Aetiological diagnosis of ischaemic stroke in Young adults. *Lancet Neurol*. 2010;9:1085-1096.
- 34.- Marquez JM, Arauz A, Góngora F, Barinagarrementeria F, Cantú C. The burden of stroke in México. *Int J Stroke*. 2015;10:251-252.

- 35.-Acosta B, Escobedo J. High burden of cardiovascular disease risk factors in Mexico: An epidemic of ischemic heart disease that may be on its way?. *Am Heart J.* 2010;160:230-6.
- 36.- Montanaro VVA, Freitas DS, Ruiz MCM, Cavalcanti EBU, Marinho PBC, Freitas MCDNB, Oliveira EMJ. Ischemic stroke in Young adults. Profile of SARAH hospital Brasilia from 2008 to 2012. *The Neurologist.* 2017;22: 61-66.
- 37.- Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association *Circulation.* 2017;135:e146–e603.
- 38.- Bang OY, Ovbiagele B, Kim JS. Nontraditional risk factors for ischemic stroke: An update. *Stroke.* 2015;46:3571-3578.
- 39.- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S; INTERSTROKE investigators. Risk factors for ischaemic and haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study.*Lancet.* 2010;376(9735):112-23.
- 40.- Peng KP, Chen YT, Fuh JL, Tang CH, Wang SJ. Migraine and incidence of ischemic stroke: A nationwide population-based study. *Cephalalgia.* 2017;37(4):327-335.
- 41.- Sells CM, Feske SK. Stroke in Pregnancy. *Semin Neurol.* 2017;37(6):669-678.
- 42.- Sacco S, Merki-Feld GS, Aegidius KL, Bitzer J, Canonico M, Kurth T, Lampl C, Lidegaard Ø, Anne MacGregor E, MaassenVanDenBrink A, Mitsikostas DD, Nappi RE, Ntaios G, Sandset PM, Martelletti P; European Headache Federation (EHF) and the European Society of Contraception and Reproductive Health (ESC). Hormonal contraceptives and risk of ischemic stroke in women with migraine: a consensus statement from the European Headache Federation (EHF) and the European Society of Contraception and Reproductive Health (ESC). *J Headache Pain.* 2017 30;18(1):108.
- 43.- Fonseca AC1, Ferro JM. Drug abuse and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(2):325.



- 44.- Bhatt N, Malik AM, Chaturvedi S. Stroke in young adults. Five new things. *Neurol Clin Pract.* 2018;8(6):501-506.
- 45.-Terni E, Giannini N, Brondi M, Montano V, Bonuccelli U, Mancuso M. Genetics of ischaemic stroke in young adults. *BBA Clin.* 2015;29:96-106.
- 46.- Majersik JJ. Single gene causes of stroke. *Semin Neurol.* 2017;37:351-365.
- 47.- Mutchinick BOM. Herencia multifactorial. En: Del Castillo RV, Uranga HRD, Zafra RG, eds. *Genética Clínica. México: Manual Moderno 2013.* p. 207-2013.
- 48.- Aparicio HJ, Seshadri S. Familial occurrence and heritability of stroke. En: Sharma P, Meschia JF, eds. *Stroke genetics.* 2nd ed. Switzerland: Springer International Publishing AG; 2017. p. 9-20.
- 49.- Lutski M, Zucker I, Shohat T, Tanne D. Characteristics and outcomes of young patients with first-ever ischemic stroke compared to older patients: The National Acute Stroke Israeli Registry. *Front Neurol.* 2017;21:421-428.
- 50.- Lisabeth L, Kardia SLR, Smith MA, Fornage M, Morgenstern L. Family history of stroke among Mexican-American and non-Hispanic white patients with stroke and TIA: Implications for the feasibility and design of stroke genetics research. *Neuroepidemiology.* 2004;24:96-102.
- 51.- Chung JW, Kim BJ, Han MK, Kang K, Park JM, Parc SS, et al. Family history and risk of recurrent stroke. *Stroke.* 2016;47:1990-1996.
- 52.- Thijs V, Grittner U, Dichgans M, Enzinger C, Fazekas F, Giese AK, Kessler C, Kolodny E, Kropp P, Martus P, Norrving B, Ringelstein EB, Rothwell PM, Schmidt R, Tanislav C, Tatlisumak T, von Sarnowski B, Rolfs A. Family history in young patients with stroke. 2015;46:1975-1978.
- 53.- Lindgren A, Lovkvist H, Hallstrom B, Hoggund P, Jonsson AC, Kristofferson U, et al. Prevalence of stroke and vascular risk factors among first-degree relatives of stroke patients and control subjects. A prospective consecutive study. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20:381-387.
- 54.- Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke.* 2004;35:212-27.

- 55.- MacClellan LR, Mitchell BD, Cole JW, Wozniak MA, Stern BJ, Giles WH, et al. Familial aggregation of ischemic stroke in young women: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Genet Epidemiol.* 2006;30:602-608.
- 56.- Bluher A, Devan WJ, Holliday EG, Nalls M, Parolo S, Bione S, et al. Heritability of young –and old- onset ischaemic stroke. *Eur J Neurol.* 2015;22:1488-1491.
- 57.- Stack CA, Cole JW. Ischemic stroke in Young adults. *Curr Opin Cardiol.* 2018;33:594-604.
- 58.- Lantz M, Sieurin J, Sjölander A, Waldenlind E, Sjöstrand C, Wirdefeldt K. Migraine and risk of stroke: a national population-based twin study. *Brain.* 2017;140:2653-2662.
- 59.- Lindgren A. Stroke genetics: A review and update. *J Stroke.* 2014;16:114-23.
- 60.- Polderman T, Benyamin B, de Leeuw CA, Sullivan PF, van Bochoven A, Visscher PM, et al. Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nat Genet.* 2015;47(7):702-9.
- 61.- Brainstorm Consortium, Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Walters RK, Bras J, Duncan L, et al. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science.* 2018;360:8757.
- 62.- Lu SS, Xie J, Su CQ, Ge S, Shi HB, Hong XN. Plasma homocysteine levels and intracranial plaque characteristics: association and clinical relevance in ischemic stroke. *BMC Neurol.* 2018;18:200.
- 63.- Esparza-García JC, Santiago-Germán D, Valades-Mejía MG, Hernández-Juárez J, Aguilar-Sosa E, Leños-Miranda A, Alvarado-Moreno A, Majluf-Cruz A, Isordia-Salas I. GLU298ASP and 4G/5G Polymorphisms and the Risk of Ischemic Stroke in Young Individuals. *Can J Neurol Sci.* 2015;42(5):310-6.
- 64.- Arauz A, Argüelles N, Guerrero J, Barboza MD. Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Polymorphisms and Cerebral Venous Thrombosis in Mexican Mestizo Patients. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(8):1291-1296.
- 65.- Rivera-García BE, Esparza-García JC, Aceves-Chimal JL, Leños-Miranda A, Majluf-Cruz A, Isordia-Salas I. Platelet glycoprotein IIIA PIA1/A2 polymorphism in

young patients with ST elevation myocardial infarction and idiopathic ischemic stroke. *Mol Cell Biochem.* 2013;384:163-71.

66.- Zhong Z, Wu H, Ye M, Yang Y, Luo W, Wu Y, Wu H, Zhong M, Zhao P. Association of APOE Gene Polymorphisms with Cerebral Infarction in the Chinese Population. *Med Sci Monit.* 2018 26;24:1171-1177.

67.- Harrison C, Acharya KR. ACE for all- a molecular perspective. *J Cell Commun Signal.* 2014;8:195-201.

68.- Williamson CR, Khurana S, Nguyen P, Byrne CJ, Tai TC. Comparative Analysis of Renin-Angiotensin System (RAS)-Related Gene Expression Between Hypertensive and Normotensive Rats. *Med Sci Monit Basic Res.* 2017;23:20-24.

69.- Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR. Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidneys, and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation.* 1995;2:3105-3112.

70.- Jiang X, Sheng H, Li J, Xun P, Cheng Y, Huang J, Xiao H, Zhan Y. Association between renin-angiotensin system gene polymorphism and essential hypertension: a community-based study. *J Hum Hypertens.* 2009;23:176-181.

71.- Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *Am J Hypertens.* 2000; 13: 121-127.

72.- Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. 1988;85:9386-9390.

73.- Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, Golia G, Franceschini L, Cabrini G, Bonizzato A, Graziani M, Anker SD, Coats AJ, Zardini P. Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1008-1012.

74.- Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40:256-265.

- 75.- Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation*. 2000;102:829-832.
- 76.- Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*. 1991;18:100-105.
- 77.- Pratt RE. Regulation of vascular smooth-muscle cell growth by angiotensin II. *Blood Press Suppl*. 1996;2:6-9.
- 78.- <https://www.omim.org/entry/106180?search=ACE&highlight=ace>
- 79.- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem*. 1991;266:15377-15383.
- 80.- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990;86:1343-1346.
- 81.- Catto A, Carter AM, Barrett JH, Stickland M, Bamford J, Davies A, Grant PJ. Angiotensin-converting enzyme Insertion-Deletion polymorphism and cerebrovascular disease. *Stroke*. 1996;27:435-440.
- 82.- Hmimech W, Idrissi HH, Diakite B, Korchi F, Baghdadi D, Tahri Joutey Hassani Idrissi H, Haboub M, Habbal R, Nadifi S. Impact of I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene on myocardial infarction susceptibility among young Moroccan patients. *BMC Res Notes*. 2017;10:763.
- 83.- Parenica J, Goldbergova MP, Kala P, Jarkovsky J, Poloczek M, Manousek J, Prymusova K, Kubkova L, Tomcikova D, Toman O, Tesak M, Tomandl J, Vasku A, Spinar J. ACE gene insertion/deletion polymorphism has a mild influence on the acute development of left ventricular dysfunction in patients with ST elevation myocardial infarction treated with primary PCI. *BMC Cardiovasc Disord*. 2010;10:60.
84. Leatham E, Barley J, Redwood S, Hussein W, Carter N, Jeffery S, Bath PM, Camm A. Angiotensin-1 converting enzyme (ACE) polymorphism in patients presenting with myocardial infarction or unstable angina. *J Hum Hypertens*. 1994;8:635-638.

- 85.- Gardemann A, Weiss T, Schwartz O, Eberbach A, Katz N, Hehrlein FW, Tillmanns H, Waas W, Haberbosch W. Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients. *Circulation*.1995;92:2796-2799.
- 86.- Zintzaras E, Raman G, Kitsios G, Lau J. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2008;168:1077-1089.
- 87.- Kato N, Tataru Y, Ohishi M, Takeya Y, Onishi M, Maekawa Y, Rakugi H. Angiotensin-converting enzyme single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for cardiovascular disease: a cohort study of hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2011;34:728-34.
- 88.- Salgado DV, Aparecida D, Neves AF, Siuffo SR, Gimenez A, Pozzan R, Mourilhe RR, Campos AD. Influence of angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism on echocardiographic data of patients with ischemic heart failure. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107:446-454
- 89.- Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation*. 1995;92:1387-1388.
- 90.- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*. 1992;51:197-205.
- 91.- Soubrier F, Wei L, Hubert C, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J Hypertens*. 1993;11:599-604.
- 92.- Duprez D. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens*. 2006;24:983-91.
- 93.- Passier RC, Smits JF, Verluyten MJ, Studer R, Drexler H, Daemen MJ. Activation of angiotensin-converting enzyme expression in infarct zone following myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1995;269:H1268-H1276.

- 94.- Wang Y, Tikellis C, Thomas MC, Golledge J. Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;226:3-8.
- 95.- Zhou L, Xi B, Wei Y, Shen W, Li Y. Meta-analysis of the association between the insertion/deletion polymorphism in ACE gene and coronary heart disease among the Chinese population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012;13:296-304.
- 96.- Markoula S, Giannopoulos S, Kostoulas C, Tatsioni A, Bouba I, Maranis S, Georgiou I, Kyritsis AP. Gender association of the angiotensin-converting enzyme gene with ischaemic stroke. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12:510-515.
- 97.- Zhang Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, Liu X. Angiotensin-converting enzyme Insertion/Deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: A meta-analysis of 50 case-control studies. *PLoS ONE* 2012;7:e46495.
- 98.- Kumar A, Vivekanandhan S, Srivastava A, Tripathi M, Srivastava P, Saini N, Kumar P, Prasad K. Association between angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and ischemic stroke in north Indian population: a case-control study and meta-analysis. *Neurol Res*. 2014;36(9):786-94)
- 99.- Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest*. 1997;99:1786-1797.
- 100.- Zhu X, Yan D, Cooper RS, Luke A, Ikeda MA, Chang YP, Weder A, Chakravarti A. Linkage disequilibrium and haplotype diversity in the genes of the renin-angiotensin system: findings from the family blood pressure program. *Genome Res*. 2003;13:173-181.
- 101.- Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet*. 1995;345:1600-1603.
- 102.- Renner W, Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Scharnagl H, Mayer V, Boehm BO, März W; LURIC Study team. Association of angiotensinogen haplotypes with angiotensinogen levels but not with blood pressure or coronary

- artery disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *J Mol Med.* 2004;83:235-239.
- 103.- Lanz JR, Pereira AC, Lemos PA, Martinez E, Krieger JE. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with coronary artery disease severity. *Clin Chim Acta.* 2005;362:176-181.
- 104.- Sethi AA, Nordestgaard BG, Grønholdt ML, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease. *Hypertension.* 2003;41:1202-1211.
- 105.- Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol.* 2005;6:1-7.
- 106.- Tousoulis D, Androulakis E, Papageorgiou N, Chatzistamatiou E, Miliou A, Moustakas G, Latsios G, Kampoli AM, Toutouzas K, Oikonomou E, Zaromytidou M, Kallikazaros I, Stefanadis C. Genetic polymorphism M235T of angiotensinogen: effects on endothelial function and arterial stiffness in hypertensives. *Int J Cardiol.* 2012;155:501-503.
- 107.- Wang YJ, Pan Y. Angiotensinogen gene M235T polymorphism and risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *Mol Med Report.* 2012;14:884-888.
- 108.- Cheng JL, Wang AL, Wan J. Association between the M235T polymorphism of the AGT gene and cytokines in patients with hypertension. *Exp Ther Med.* 2012;3:509-512.
- 109.- Nakase T, Mizuno T, Harada S, Yamada K, Nishimura T, Ozasa K, Watanabe Y, Nagata K. Angiotensinogen gene polymorphism as a risk factor for ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2007;14: 943-947.
- 110.- Wang B, Guo Q, Peng Y, Lu J, Singh B, Hua B. Association of AGT M235T and ACE I/D polymorphisms with the risk of ischemic stroke: meta-analysis in Han Chinese population. *J Neurol Sci.* 2012;320:79-84.
- 111.- Wang WZ. Association between T174M polymorphism in the angiotensinogen gene and risk of coronary artery disease: a meta-analysis *Hypertens Res.* 2012;35:70-6.

- 112.- Gu W, Liu Y, Wang Z, Liu K, Lou Y, Niu Q, Wang H, Liu J, Wen S. Association between the angiotensinogen gene T174M polymorphism and hypertension risk in the Chinese population: a meta-analysis. *Hypertens Res.* 2012;35:70-76.
- 113.- Liao X, Yang Z, Peng D, Dai H, Lei Y, Zhao Q, Han Y, Wang W. Association of T174M polymorphism of angiotensinogen gene with essential hypertension: A meta-analysis. *Genet Mol Biol.* 2014;37:473-479.
- 114.- Wang J-H, Lin C-M, Wang L-S, Lai N-S, Chen D-Y and Cherng J-M. Association between molecular variants of the angiotensinogen gene and hypertension in Amis tribes of eastern Taiwan. *J Formosan Med Assoc.* 2002;101:183-188.
- 115.- Nejatizadeh A, Kumar R, Stobdan T, Goyal AK, Gupta M, Javed S and Pasha MQ. Significance of angiotensinogen gene haplotypes and genotypes combinations in hypertension. *J Hypertens.* 2008;26:1094-1101.
- 116.- Gao T, Huang L, Fu Q2, Bai Y. Association of polymorphisms in the AGT gene (M235T, T174M) with ischemic stroke in the Chinese population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16:681-686.
- 117.- Tuncer N, Tuglular S, Kiliç G, Sazci A, Us O, Kara I.. Evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of ischaemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2006;13:224-227.
- 118.- Pera J, Slowik A, Dziedzic T, Wloch D, Szczudlik A. ACE I/D polymorphism in different etiologies of ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2006;114,320-322.
- 119.- Karagiannis A, Balaska K, Tziomalos K, Tokalaki- Nikolaidou L, Papayeoryiou A, Zamboulis C. Lack of an association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and ischaemic stroke. *Eur J Neurol.* 2004;51:148–152.
- 120.- Domingues-Montanari S, Fernandez-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Mendioroz, M, Ribo M, Obach V, Marti-Fabregas J, Freijo m, Serena J, Corbeto N, Chacon P, Alvarez-Sabin J, Montaner J. The I/D polymorphism of the ACE1 gene is not associated with ischaemic stroke in Spanish individuals. *Eur J Neurol.* 2010;17:1390–1392.



- 121.- Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin- converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Medicine*. 2006;3:353–360
- 122.- Mostafa MA, El-Nabiel LM, Fahmy NA, Aref H, Shreef E, Abd El-Tawab F, Abdulghany OM. ACE gene in Egyptian ischemic stroke patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25:2167-2171.
- 123.- Das S, Roy S, Vandana Sharma V, Kaul S, Jyothy A, Munshi A. Association of ACE gene I/D polymorphism and ACE levels with hemorrhagic stroke: comparison with ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2015;6:137-142.
- 124.- Saidi S, Mallat SG, Almawi WY, Mahjoub T. Association between renin-angiotensin-aldosterone system genotypes and haplotypes and risk of ischemic stroke of atherosclerotic etiology. *Acta Neurol Scand*. 2009;119:356-363.
- 125.- Bao H, Hao JJ, Yang YM, Xu XH, Wang Y, Zuo L, Lu J, Zhang J, Zhang Y, Xu SY, Wang X, Li Y, Li G. Angiotensinogen polymorphism and ischemic stroke risk. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:12914-12920.
- 126.- Wang S, Zeng R, Lei L, Huang J. Angiotensinogen gene polymorphism and ischemic stroke in East Asians: A meta-analysis. *Neural Regen Res*. 2013;8:1228-1235.
- 127.- Liang B, Qin L, Wei H, Yan Y, Su L, Wu G, Tan J, Gu L. AGT M235T polymorphisms and ischemic stroke risk: a meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2013;15:118-25.
- 128.- Um JY, Kim HM, Park HS, Joo JC, Kim KY, Kim YK, Hong SH. Candidate genes of cerebral infarction and traditional classification in Koreans with cerebral infarction. *Int J Neurosci*. 2005;115:743-756.
- 129.- Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Gronholdt ML, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. Angiotensinogen mutations and risk for ischemic heart disease, myocardial infarction, and ischemic cerebrovascular disease. Six case–control studies from the Copenhagen City Heart Study. 2001;134:941–954.

- 130.- Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Böhm BO, Maier V, Zotz R, Matheis G, Wolf A, Wieland H, Gross W, Galton DJ, März W. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J.* 1999;137:698-705.
- 131.- Ou Z, Chen H, Liu G, Li C, Lin S, Lin J. Association between angiotensinogen T174M polymorphism and ischemic stroke: A meta-analysis. *J Res Med Sci.* 2015;20:619-623.
- 132.- Liu Y, Jin W, Jiang ZW, Zhang KX, Sheng HH, Jin L, Sheng YY, Huang W, Yu JD. Relationship between T174M and M235 T polymorphisms of angiotensinogen gene and brain infarction. *J Shanghai Second Med Univ.* 2004;24:351-353.
- 133.- Wei LK, Au A, Menon S, Griffiths LR, Kooi CW, Irene L, Zhao J, Lee C, Alekseevna AM, Hassan MRA, Aziz ZA. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and Ischemic Stroke: Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;24:2482-2493.
- 134.- Isordia-Salas I, Barinagarrementeria-Aldatz F, Leaños-Miranda A, Borrayo-Sánchez G, Vela-Ojeda J, García-Chávez J, Ibarra-González I, Majluf-Cruz A. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with idiopathic ischemic stroke in the young *Mexican-Mestizo* population. *Cerebrovasc Dis.* 2010;29:454-459.