



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**Epidemiología de la Enfermedad Vascolar
Cerebral de tipo isquémico en México y proyecto
GENISIS**

TÉSIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN NEUROLOGÍA

PRESENTA:

Alonso Gutiérrez Romero

TUTOR DE TESIS

Dr. Ángel Antonio Arauz Góngora

Ciudad de México. Agosto 11 de 2017





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.

"Morir, es dormir... Y dormir, tal vez soñar.
Ese sueño de muerte que soñamos puede llegar,
cuando hayamos abandonado este despojo mortal."

William Shakespeare - Hamlet -

Dedicatoria para:

Ana María por recordarme (re: pasar de nuevo; cor/cordis: corazón// Volver algo al presente habiéndolo hecho pasar por el corazón) que después de todo, la muerte es solo un síntoma de que hubo vida (y enseñaste a vivirla bien).

Papá por creer en el intento, apostar en el proyecto y soportar el recorrido.

Mamá por el apoyo físico, moral, mental, caprichoso y testarudo.

Juan Pablo por colocarme en la cabecera de su futura agonía desde el inicio y por aplazarme y resolverme los ahogos.

Rodrigo por la transmisión constante de fuerza, mesura, gallardía e impulso.

Vicente Guerrero por la pericia y el arte para comprender y, sobre todo, enseñar... ¡profundas gracias a mi maestro!

Y por supuesto, **Vanessa**, por llenar de luz, alegría y pelmas toda la travesía y hartar de sentido toda mi insolencia y manía.

Índice

Parte I.

Objetivos Específicos	4
a. Arquitectura genética de la isquemia cerebral humana	
b. Epidemiología del ictus isquémico en población mexicana adulta	
Arquitectura genética cerebral humana	
a. Introducción	
Hipótesis	5
Objetivo 1.....	7
a. realizar estudios con una asociación genómica amplia, examinando la mejoría neurológica temprana o el deterioro después de un EVCia	
Objetivo 2	
a. determinar cuáles de las variantes genéticas que modulan los niveles de analitos plasmáticos son relevantes para la influencia de los desenlaces neurológicos tempranos en cuanto a la patogénesis del EVCia	
Objetivo 3	
a. replicar las asociaciones del genoma ampliado, nosotros evaluaremos las variantes y los genes de los individuos en una cohorte independiente de pacientes con EVCia; Estrategia de investigación	8
Innovación	14
Enfoque.....	17
a. visión general del proyecto	
Desglose del objetivo 1.....	18
a. poder de los cálculos	23
Desglose del objetivo 2	27
Desglose de objetivo 3	32
Desglose de objetivo 4	39
Protección de los seres humanos	42
Criterios de inclusión y de exclusión	43
Conciliación de protección contra los riesgos	44

Parte II.

Epidemiología del ictus isquémico en población mexicana adulta	46
a. Introducción	
Hipótesis y justificación	49
Plan de trabajo	50
Material y métodos	50
Resultados	50
Discusión	73
Conclusiones	74
Bibliografía	75

Inestabilidad genética después de un ictus isquémico (GENISIS)

Protocolo 2, versión 1

Objetivos específicos:

- I. Arquitectura genética de la isquemia cerebral humana
 - II. Epidemiología del ictus isquémico en población mexicana adulta
-

I. Arquitectura genética de la isquemia cerebral humana

Introducción

Durante las primeras horas después del inicio de un ictus isquémico, los trastornos neurológicos son altamente inestables y variables entre los individuos – algunos de ellos mejoran espontáneamente mientras que otros se deterioran . Estos cambios neurológicos tempranos son importantes debido a que tienen gran influencia en los desenlaces a largo plazo.

En la escala de evaluación del ictus según el Instituto Nacional de la Salud (National Institute of Health Stroke Scale [NIHSS]), los cambios en las primeras 24 horas después de un ictus (Δ NIHSS_{24h}) representa más del 30% de la varianza reflejado en la discapacidad que esto ocasiona en los primeros 3 meses, revelado en el puntaje modificado de Rankin (modified Rankin Score [mRS]). Algunos mecanismos potenciales que deben ser tomados en cuenta para la rápida mejoría incluyen la fibrinólisis/reperfusión, la circulación colateral, o los mecanismos neuro protectores endógenos; mientras que los mecanismos que favorecen el deterioro son la propagación del trombo, la diseminación peri- infarto o la transformación hemorrágica.

El fármaco tisular activador de plasminógeno (tPA), es el único aprobado por la FDA para el tratamiento del ictus isquémico agudo, ya que aumenta la posibilidad de fibrinólisis y reperfusión; aunque también incrementa las posibilidades de hemorragia.

Actualmente en México, una de las principales causas de muerte, al igual que en el resto del mundo, son las enfermedades cardiovasculares; Además, no solo representa un problema de mortalidad sino también de morbilidad ya que

representa la causa número 1 de discapacidad laboral; debido a que la prevalencia del ictus es mayor en hombres, y son ellos quienes continúan siendo - en la mayoría de las familias - los proveedores únicos, también representa una importante causa de pobreza extrema en la población mexicana.

El estudio Framingham, iniciado hace más de 65 años, demostró ciertos factores de riesgo cardiovascular que aún siguen siendo vigentes para nuestro país. Sabemos que la edad mayor de 45 años, el sexo masculino, la raza hispanoamericana, el índice cintura-cadera, la coexistencia con hipertensión arterial, diabetes mellitus, el sedentarismo y el consumo de tabaco, son factores que ensombrecen el pronóstico una vez que el paciente ya ha cursado con la enfermedad y son factores predisponentes para ictus, entre otras patologías.

Con base en el anterior, nos hemos propuesto identificar las variables predisponentes de nuestra población para el ictus, así como cuales de estas pueden brindarle al paciente un pronóstico favorable o desfavorable.

Hipótesis

Creemos que las variantes genéticas que afectan los mecanismos patogénicos durante la isquemia aguda pueden influir en los desenlaces neurológicos tempranos después de un ictus isquémico agudo, y también pueden modular la respuesta de tPA intravenoso. En esta subvención, nos hemos propuesto identificar las variantes genéticas asociadas con Δ NIHSS_{24h} en los pacientes que cursan con ictus isquémico agudo (tratados o no con tPA intravenoso).

Estos datos nos permitirán encontrar nuevos genes o vías y, junto con ellos, novedosos blancos terapéuticos que puedan mejorar los desenlaces después de un ictus isquémico agudo, y tal vez mejorar la eficacia de tPA. Adicionalmente, el perfil genético de una persona puede proporcionar un día la estratificación personalizada del riesgo para el tratamiento con tPA intravenoso, lo cual puede guiar decisiones terapéuticas.

De hecho, utilizando el enfoque de un gen candidato, el Dr. Montaner (co-PI, Barcelona, España) recientemente encontró variantes comunes en la α -2-macroglobulina (A2M) y el factor XII (F12) que estuvieron significativamente asociados con hemorragia y mortalidad temprana después del tratamiento con

tPA. Estos resultados son los primeros en encontrar influencia genética específica en los desenlaces tempranos del ictus isquémico agudo.

Los análisis genéticos recientes de los rasgos complejos muestran que las variantes comunes explican solo una pequeña porción de la herencia genética esperada. Se ha sugerido que los efectos acumulativos de las raras mutaciones pueden explicar una amplia fracción de herencia. En esta propuesta, nosotros planeamos utilizar técnicas genéticas originales para analizar los efectos tanto de las variantes comunes como raras. Los datos preliminares de los doctores Lee & Cruchaga (co-PI & co-I, St. Louis, MO) utilizando enfoques de variantes poco comunes en 191 pacientes con ictus isquémico agudo (EVCia) han identificado varios genes prometedores asociados con desenlaces neurológicos tempranos (Δ NIHSS_{24h}), incluyendo IFIT1 (proteína inductora de interferón con repetidos tricopéptidos), los cuales alcanzan significancia genómica amplia. Encontraron tres extrañas variantes en la población; todas ellas estuvieron asociadas con deterioro neurológico temprano. IFIT1 pertenece a una familia de genes los cuales se inducen rápidamente por interferón, infección viral, exposición a lipopolisacáridos (LPS) y estrés agudo (incluyendo isquemia). El análisis de las vías reveló que los genes con la variante de interferón estuvieron asociados significativamente con Δ NIHSS_{24h}. Los estudios en modelos animales previos sugirieron que los interferones tipo 1 e IFIT1 son parte de una cascada neuro protectora estimulada por estipulación previa (LPS o isquemia breve). Por tanto, IFIT1 es uno de los genes candidatos biológicamente plausibles que pueden influir en los desenlaces posteriores al EVCia. Estos datos preliminares sugieren que el abordaje con raras variantes que aquí se propone es efectivo para identificar genes con efecto de gran tamaño en poblaciones relativamente pequeñas con EVCia.

Recientemente, se han acumulado cerca de 1000 muestras de pacientes con EVCia tratados y no tratados con tPA (es la muestra más grande de todo el mundo de la que se tiene registro), la cual será utilizada para el descubrimiento de genes (*Serie de Descubrimiento*).

Durante este periodo de recolección y análisis, se han juntado alrededor de 3000 muestras (*Serie de Replicación*) que incluyen pacientes tratados y no tratados para así poder determinar cuáles asociaciones genéticas tienen influencia

dependiente o independiente con respecto al tPA en cuestión de los desenlaces tempranos del EVCia.

Objetivo 1: realizar estudios con una asociación genómica amplia, examinando la mejoría neurológica temprana o el deterioro después de un EVCia. Utilizando nuestra Serie de descubrimientos actualmente disponible nosotros haremos:

- a. Descubrimientos de nuevas variantes, genes o vías que están asociadas con Δ NIHSS_{24h}.
- b. Replicar la asociación entre las variantes IFIT1 y el deterioro neurológico temprano consecutivo al EVCia.

Objetivo 2: determinar cuáles de las variantes genéticas que modulan los niveles de analitos plasmáticos son relevantes para la influencia de los desenlaces neurológicos tempranos en cuanto a la patogénesis del EVCia.

Utilizando el conjunto de datos genotipificados preexistentes ligados a las medidas analíticas plasmáticas (Human DiscoveryMAP) de la Iniciativa Neuroimagenológica de la Enfermedad de Alzheimer (ADNI) y del ADRC de la Universidad de Washington, nosotros realizaremos GWAS para identificar las variables que influyen en los niveles plasmáticos analíticos que resultan relevantes para la patogénesis del EVCia (p. ej.: A2M, PAI-1, IL6 y CRP). Posteriormente, determinaremos si estos genes/vías influyeron en los desenlaces neurológicos después del EVCia en nuestra Serie de Descubrimiento.

Objetivo 3: replicar las asociaciones del genoma ampliado, nosotros evaluaremos las variantes y los genes de los individuos en una cohorte independiente de pacientes con EVCia. Fenotipificaremos 3,000 pacientes con EVCia (tratados con t-PA y no tratados) para replicar las asociaciones del genoma ampliado encontradas en el objetivo 1. Secuenciaremos los exones de los candidatos encontrados en el objetivo 1 en esta Serie de Replicación para aumentar el rendimiento de detección de nuevas y raras variantes y asociaciones genéticas novedosas.

Objetivo 4: Determinar cuáles variantes asociadas con desenlaces tempranos son dependientes de tPA. Cerca del 50% de la cohorte combinada Descubrimiento + Replicación recibirá tPA intravenosa. Utilizaremos el análisis

de interacción GxE para determinar cuáles variantes neurológicas tempranas son tPA dependientes y cuales son no dependientes.

Estrategia de investigación

A. Significancia

Desenlaces neurológicos tempranos. El ictus es la segunda causa de mortalidad más frecuente en el mundo, y la principal causa de discapacidad a largo plazo. El ictus isquémico, subtipo más frecuente, es ocasionado por la oclusión de una arteria del cerebro, causando desarrollo abrupto de déficit neurológico. Durante las primeras horas después del inicio del ictus isquémico, el deterioro neurológico puede ser muy inestable, encontrando muchos pacientes que mejoran espontáneamente, pero otros tantos que se deterioran. Estos cambios que se desarrollan dentro de la etapa aguda del evento tienen repercusión sustancial en el desenlace del largo plazo. Los cambios en la escala de ictus NIH, de su estado basal hacia las 24 horas después del ictus ($\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$), representa más del 30% del incremento de la varianza en la escala de Ranking modificada a los 3 meses. (Tabla 1).

Tabla 1. Incremento de la varianza en 90 días explicado con la mRS por ΔNIHSS (ajustado R^2)		
Intervalo de tiempo	Placebo	tPA
Basal	0.25	0.16
Basal - 24 horas	0.56	0.56
24 horas – 10 días	0.65	0.65
10 días – 90 días	0.71	0.73

Muchos mecanismos potenciales suman para estos cambios tempranos. Por ejemplo, la rápida mejoría puede ser ocasionada por fibrinólisis endógena y reperfusión, el reclutamiento de la circulación colateral o mecanismo neuroprotectores endógenos; mientras que el deterioro puede deberse a propagación del trombo, fallo en las colaterales, depresión peri infarto diseminada o transformación hemorrágica. Es probable que las variantes genéticas sean responsables de estos mecanismos ya conocidos, como también resulta probable que existan más mecanismos por ser descubiertos.

Debido a que el parénquima cerebral continúa siendo viable durante las fases tempranas de la isquemia, las maniobras terapéuticas para lisar o extraer mecánicamente el coágulo son prioritarias durante las primeras 6 a 8 horas después del inicio del ictus. Si la distribución del coágulo es satisfactoria en corto periodo de tiempo, los pacientes generalmente muestran cierto grado de mejoría; en algunos casos, los enfermos se deterioran porque las intervenciones pueden ocasionar hemorragia en la región isquémica. Resulta atrayente que $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ corresponda a un incremento de la varianza aún mayor (40%) en los pacientes tratados con t-PA comparados contra placebo, mientras que la contribución con otras variables de tiempo no cambian (Tabla 1). Estos datos sugieren que $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ atrapa una amplia proporción de la varianza perteneciente a la discapacidad de largo plazo, y contribuye en una población aún mayor después del tratamiento con t-PA, el cual tiene un claro efecto tiempo-dependiente y está ligado a mecanismo de fibrinólisis temprana y en su defecto, lesión isquémica.

Biomarcadores de los desenlaces neurológicos tempranos. Tomando en cuenta los desenlaces extremos asociados con el tratamiento tPA, cualquier biomarcador que pueda estratificar el riesgo del paciente o el beneficio será de gran utilidad en las decisiones para el tratamiento agudo. El laboratorio del Dr. Montaner ha acumulado un respaldo significativo de información que sugiere que varios marcadores plasmáticos obtenidos de la primera presentación al hospital pueden predecir los desenlaces neurológicos tempranos en pacientes tratados con tPA. Los niveles plasmáticos basales de matriz metaloproteínasa-9 (MMP-9) fueron identificados como predictor independiente de transformación hemorrágica después del tratamiento con tPA, con razón de momios de 9.62. Además, los niveles de la proteína C reactiva (PCR) demostraron ser significativos y predictores independientes de mortalidad después del uso de tPA y los niveles de IL-6 predicen deterioro neurológico en pacientes no tratados. Últimamente, hemos encontrado que ciertos perfiles genéticos específicos pronostican pobres desenlaces en pacientes tratados con tPA. Un solo polimorfismo genético (SNP) en la α -2-macroglobulina (A2M) predice transformación hemorrágica, mientras que SNP en el factor XII (F12) se asoció con muerte hospitalaria. Ambas variables genéticas estuvieron asociadas con niveles plasmáticos basales elevados (lo que significa mayor actividad de los

factores respectivos). Todos estos biomarcadores son responsables probables en los mecanismos que favorecen los desenlaces respectivos. En el objetivo 2 de esta subvención, propusimos encontrar variantes o genes que influyesen en los niveles de estos biomarcadores para determinar si estas variantes/genes interceden en los desenlaces neurológicos tempranos de un EVCia.

Genética del riesgo de ictus isquémico. El ictus isquémico es un síndrome complicado con varias etiologías subyacentes, en lugar de tener una causa bien definida. De hecho, la reciente asociación de estudios genéticos ampliados (GWAS – genome-wide association study-) dejó ver que el loci individual que muestra asociación para el ictus isquémico es específico para el subtipo de ictus. Por ejemplo, dos polimorfismos en el cromosoma 12p13 se asocian con ictus aterotrombóticos en distintas poblaciones; mientras que el SNPs en el cromosoma 6p21.1, cromosoma 9p21, y uno localizado en el gen HDAC9 (cromosoma 7p21.1) han reportado estar asociados específicamente con ictus ateroscleróticos de grandes vasos en pacientes con antecedentes europeos. La asociación de SNPs con fibrilación auricular solo ha encontrado ser relevante cuando se asocia a ictus cardioembólico. Asimismo, análisis recientes han comprobado y verificado la asociación de ictus cardioembólico en el loci 2 (genes PITX2 y ZFX3), de los cuales, ambos estuvieron inicialmente asociados con fibrilación auricular. Por lo tanto, la etiología del ictus isquémico con base en arquitectura genética empieza a ser lentamente revelada. Mientras que muchos estudios gastan esfuerzos en determinar la genética de los factores de riesgo para ictus isquémico, son pocos los que se han dedicado a estudiar los desenlaces después del evento, tema novedoso que se propone en este trabajo.

Acercamientos genéticos novedosos. La herencia genética de la enfermedad fue explorada en un principio a través del análisis que vincula a los gemelos y las familias, pero que a su vez está limitada por pequeños tamaños de muestras y con el sesgo que puede representar compartir los mismos factores ambientales. Con la llegada de la secuenciación y la clonación génica, el enfoque se desplazó a los genes candidatos, en los cuales, la frecuencia de una variante en un gen conocido fue comparada entre casos y controles. Sin embargo, muchos de estos estudios entregan falsos positivos. La finalización del Proyecto

del Genoma Humano (HGP) y el proyecto subsecuente Internacional de HapMap que creó una amplia base de datos genética de variaciones humanas secuenciales, proporcionan la información necesaria para guiar los estudios genéticos a fenotipos clínicos. Con esta herramienta actualmente disponible, GWAS – estudio de asociaciones a través de todo el genoma – se ha convertido en una realidad y ha transformado el entendimiento genético de enfermedades complicadas. De cualquier manera, GWAS tiene el poder suficiente para detectar asociaciones con las variantes causales o aquellas variantes que están vinculadas a un desequilibrio que es relativamente común en la población. La acumulación de evidencia demuestra que el impacto de GWAS, explica solo una pequeña proporción de herencia genética de las enfermedades complejas, favoreciendo la hipótesis que las variables de baja frecuencia juegan un papel más extenso.

Actualmente, se encuentra disponible una colección novedosa de raras variantes genéticas que promete revelar asociaciones genéticas con efectos de mayor tamaño, requiriendo poblaciones más pequeñas.

Estudios preliminares. En el primer grupo de 191 pacientes con EVCia que recibieron tratamiento con tPA, realizamos un análisis preliminar para determinar si las variantes raras codificadas influían en el Δ NIHSS. Estos datos preliminares demostraron el poder de los fenotipos cuantitativos (Δ NIHSS_{24h}), y el análisis genético de las variantes extrañas. El ADN de estas 191 personas (121 descendientes de europeos y 70 Áfrico-americanos), fueron genotipificados utilizando el chip del exoma Affymetrix, una colección mayor a 30,000 códigos de SNPs e información ancestral de marcadores informativos los cuales permiten estratificar a la población. El chip también incluye cerca de 5,000 SNPs significativos en el amplio genoma asociados con varias enfermedades reportadas en el Catalogo de Asociaciones Públicas NHGRI (agosto 2011), Todas las muestras y genotipos se sometieron a un control estricto y los datos del genotipo fueron limpiados por medio de la aplicación de un mínimo de tasas de llamadas por SNPs e individuos (98%). Los SNPs que no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 1 \times 10^{-6}$) fueron excluidos. Examinamos los duplicados y las relaciones enigmáticas utilizando un par de estimados proporcionales de la identidad según el origen del genoma ampliado. Utilizamos

Eigenstrat en nuestras muestras junto con las muestras HapMap como anclajes para confirmar la raza/etnia reportada por los propios individuos. Los tres componentes principales fueron calculados e incluidos en el análisis. Todos los análisis fueron realizados de dos formas: 1) todas las muestras se analizaron juntas (descendientes europeos -EA-, Áfrico-americanos -AA-) utilizando los componentes principales como covariable; y 2) EA y AA fueron analizados por separado, y los valores de p se combinaron por meta análisis. Ambos análisis produjeron el mismo resultado. Primero efectuamos un análisis de variable única utilizando Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>), incluyendo edad, NIHSS basal y componentes principales (CPs) como covariables. Como se esperaba, debido a la pequeña muestra, no encontramos ninguna señal significativa del genoma. Sin embargo, encontramos diversas variables con valores sugestivos de P ($<1 \times 10^{-5}$, tabla 2). Con el fin de extender la fuerza y la extensión del análisis para obtener impacto real de las variables raras, realizamos análisis basado en los genes. Se utilizó SKAT-O porque permite la inclusión de covariables en el modelo, y concede variables con efectos opuestos (mejoría o deterioro) en el mismo gen. Solo las variables que no son sinónimo fueron incluidas. En nuestra población, hubo 16,378 genes con al menos un SNP heterocigoto. Un gen, IFIT1 ($P=2.8 \times 10^{-7}$), con base en la corrección de múltiples pruebas genómicas del gen pasado ($P < 3 \times 10^{-6}$) (Figura 1).

Tabla 2. Análisis de variantes únicas ΔNIHSS_{24h}				
Chr.	SNP	Valor de P	Gen	Tipo SNP
1	Affx-5645884	1.69×10^{-06}	EPHA2	splice-site
7	Affx-29964921	2.39×10^{-06}	LRRC61	nonsense
15	Affx-52169491	4.60×10^{-06}	DUOX2	missense
17	Affx-14070383	4.60×10^{-06}	DGKE	missense
1	Affx-9662931	4.89×10^{-06}	CSF3R	missense
8	Affx-52288740	5.16×10^{-06}	TEX15	missense
10	Affx-52134793	7.37×10^{-06}	SLC16A12	missense
5	Affx-52262225	7.37×10^{-06}	C5orf45	missense
10	Affx-52134767	7.37×10^{-06}	IFIT1	missense
8	Affx-52285238	7.37×10^{-06}	ENPP2	missense
5	Affx-25326426	7.53×10^{-06}	DAP	missense
11	Affx-5491454	9.42×10^{-06}	TRIM5	intronic
Se realizó el análisis en 191 individuos incluyendo edad, NIHSS basal, componentes principales y covariables.				

Posteriormente, regresamos al análisis de variante única para determinar cuáles de las variantes de IFIT1 fueron llevadas a la asociación basada en genes. Asombrosamente, todas las variantes polimórficas que no eran sinónimas en IFIT1, estuvieron asociadas con deterioro neurológico (NIHSS_{24h} negativo) (Tabla 3).

Tabla 3. Todas las variantes IFIT1 asociadas con deterioro neurológico					
SNP	Cambio AA	MAF (%)	# hets	Valor de p	Tamaño del efecto
Affx-52134764	T3K	1.2	6	0.034	-5.7
Affx-52134767	M108T	0.3	2	7.37x 10 ⁻⁶	-16.26
Affx-52134774	R262X	0.2	1	0.002	-16.29

En promedio, los portadores de las variantes de IFIT1 mostraron Δ NIHSS_{24h} 9.5 puntos menos que los no portadores (Figura 2). Debido a que el IFIT1 es un gen inductor de interferón, nosotros realizamos análisis de las vías, incluyendo 21 genes y receptores relacionados con interferón (68 variantes polimórficas no sinónimas). Esta vía mostró una asociación altamente significativa ($P=2.30 \times 10^{-3}$) con Δ NIHSS_{24h} (No se incluyó IFIT1 en este análisis). Las vías de IFIT1 e interferón fueron claramente sugestivas que el interferón y los genes relacionados ocupan un papel preponderante en los desenlaces neurológicos tempranos después del EVCia. Realizamos replicación utilizando los 809 pacientes restantes en la Cohorte Discovery (objetivo 1). Actualmente, tenemos la influencia de la replicación biológica de IFIT1 en los pacientes con infarto que se deterioran después de un ictus, ya que estos han mostrado tener niveles sanguíneos de ARNm IFIT1 bajos que aquellos que mejoran. Estos resultados ilustran el poder de nuestro abordaje.

Mientras que las asociaciones de este genoma ampliado con IFIT1 fueron encontrados en una población consistente solo con pacientes con EVCia tratados con tPA, no queda claro si la influencia genética de esta variante en el deterioro neurológico temprano es dependiente de tPA.

IFIT1 es parte de una familia evolutivamente conservada. Normalmente silente, la transcripción se induce rápido por una variedad de estímulos relacionados con

estrés: infecciones virales, ADN/ARN de doble cadena, interferones, lipopolisacáridos e isquemia. Además de la estimulación, IFIT1 se expresa en una variedad de células: expresión prominente en monocitos periféricos y células T; en el cerebro, las neuronas piramidales del hipocampo CA1/CA2 y los astrocitos a través del cerebro. Muchos estudios se han centrado en actividades antivirales de IFIT1 y han demostrado numerosos procesos antivirales, incluyendo la inhibición de la proteína de traducción, migración celular, proliferación, señalización y replicación viral. Sin embargo, algunos estudios recientes han sugerido un papel novedoso para IFIT1 en neuroprotección debido al estímulo precondicionado seguido de isquemia focal en modelos animales. Se sabe desde tiempo atrás que el interferón- β es neuroprotector después de una isquemia focal en ratones, ratas y conejos. Los interferones tipo 1 (α y β) son terapéuticos para el tratamiento de esclerosis múltiple. El mecanismo de acción parece ser por medio de propiedades antiinflamatorias y/o mejorar la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE); así pues, se han propuesto mecanismos parecidos después de la isquemia focal.

B. Innovación:

Innovación conceptual: hasta la fecha, la mayoría de estudios del GWAS se han centrado en el riesgo de ictus utilizando diseños de casos y controles, y han identificado varios genes y loci de riesgo. Estas asociaciones genéticas tienen implicaciones para la etiología subyacente de ictus. *En la aplicación de este trabajo, nosotros cambiamos de perspectiva para enfocarnos en los desenlaces tempranos del ictus isquémico.*

Para nuestro desenlace primario, hemos escogido Δ NIHSS_{24h}, escala cuantitativa que captura una variedad de mecanismos parecidos involucrados en la isquemia cerebral aguda. El descubrimiento de las variables genéticas asociadas con Δ NIHSS_{24h}, puede favorecer a la identificación de blancos terapéuticos potenciales para el tratamiento de EVCia. Además, de confirmar el mecanismo que pudo haber sido examinado antes en modelos animales, nosotros esperamos descubrir nuevos mecanismos que no se han estudiado previamente. El diseño de nuestro estudio también nos permitirá distinguir variantes que influyan en el desenlace ya sea dependiente de tPA o independiente. Estos resultados serán importantes para el entendimiento del

riesgo/beneficio individual cuando las personas reciben tratamiento, pero también marcará la pauta para identificar variantes o genes que modifiquen la eficacia de tPA.

Innovación técnica: *Los rasgos cuantitativos proporcionan mayor poder que los rasgos dicotómicos de estudios genéticos y se han utilizado de forma satisfactoria en estudios genéticos de múltiples enfermedades complejas. Los rasgos cuantitativos son mayormente afectados por variaciones genéticas y proporcionan un modelo biológico relacionando las variabilidades genéticas en los rasgos. Con base en estudios previos, nosotros estimamos que los rasgos cuantitativos proporcionan 3 a 5 veces más poder que los diseños de casos y controles. Por ejemplo, utilizando en el líquido cerebroespinal (LCR) los niveles de tau como endofenotipo cuantitativo para la enfermedad de Alzheimer, identificamos recientemente tres nuevos loci implicados en la enfermedad (Cruchaga et al., Neuron. In Press); uno de los loci se ubica en el conjunto de los genes TREM – una nueva variante con tamaño de gran efecto para el riesgo de Alzheimer (EA). Este estudio se realizó utilizando solo 1,300 personas – una muestra más pequeña que la que se había propuesto en este estudio. Los resultados ilustraron claramente el poder y utilidad de los rasgos cuantitativos.*

Es conciencia creciente que los loci identificados por GWAS expliquen solo una escasa fracción del riesgo heredado en cuanto a los rasgos complejos, sugiriendo que las variantes inauditas corresponden a una fracción extensa de herencia inexplicable. Esta hipótesis está apoyada por diversos estudios con efecto de gran tamaño, incluyendo diabetes mellitus tipo 1, cáncer colorrectal, pancreatitis, tuberculosis e EA. Estos estudios confirman que las enfermedades comunes con frecuencia pueden estar causadas por alelos poco comunes, los cuales hasta hace poco tiempo solamente podían ser identificados por resecuenciación de grandes números de individuos. Los esfuerzos recientes de colaboradores y esfuerzos internacionales, como el proyecto de mil genomas y el servidor de las variantes del exoma (EVS: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) han creado una base de datos comprensible con cuenta de alelos a partir de todo el genoma y toda la secuenciación de exoma desde aproximadamente 5,500 individuos. Illumina y Affymetrix han desarrollado arreglos genotípicos especiales (chips de exoma, variantes 300,000 +) las cuales incluyen todos los códigos y

las variantes de los sitios de empalme encontradas al menos dos veces en toda esta base de datos. Estos nuevos chips proporcionan un método poderoso, poco caro y simple para evaluar la asociación de estas variantes raras. De cualquier forma, esta nueva tecnología viene con nuevos retos. La mayoría de las variantes codificadas incluidas en el chip del exoma son variantes extrañas (el alelo de menor frecuencia (MAF) <0.01). Con el fin de analizar el impacto completo de cada una de las raras variantes codificadas, realizaremos una base genómica novedosa y poderosa con métodos estadísticos. También utilizaremos SKAT o c-alfa para analizar la asociación de estas variantes con los desenlaces del ictus a nivel génico, porque estos métodos combinan variantes de una prueba de carga sin asumir una sola dirección del efecto, y que puede incluir covariables, tales como, edad, NIHSS basal, principal factor de la estratificación de la población. *Uno de los aspectos más innovadores de esta propuesta es el uso del chip de exomas para analizar los efectos de las variantes raras y moderadamente raras codificadas con gran efecto de tamaño en los desenlaces neurológicos consecutivos a EVCia.*

Innovación colaboradora: Hemos construido un equipo con experiencia bastante diversa pero complementaria en dos sitios, los cuales actualmente están recaudando información de muestras genómicas y fenotipificando a los pacientes con EVCia. Como miembros del Consorcio Internacional de genómica del Ictus (ISGC {International Stroke Genetics Consortium}) familiarizados con el proyecto en curso de genómica del ictus a lo largo de todo el mundo, *nosotros creemos que estos dos centros son los únicos que se dedican exclusivamente a fenotipificar los puntos finales neurológicos tempranos posterior al EVCia para estudio genético, y las muestras actuales representan la recopilación más grande del mundo de muestras genéticas de pacientes con EVCia tratados con tPA.* Joan Montaner es neurólogo vascular y jefe del Laboratorio de Investigación Neurovascular en el Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR) y su hospital hermano el Hospital Universitario Vall d'Hebron (VHUH) en Barcelona, España. Él estudia los perfiles genéticos y biomarcadores de los pacientes con EVCia tratados con tPA y ha publicado extensamente en su campo de trabajo. Es punta de lanza en estudios farmacogenómicos de la población tratada con tPA. Co-PI Jin-Moo Lee es Profesor y Director de la sección de Enfermedad Cerebrovascular en el Departamento de Neurología en la Escuela Universitaria

de medicina Washington y del Hospital Barnes-Jewish en St. Louis, MO. Sus investigaciones se han enfocado en el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la neurodegeneración debido a la lesión cerebral. Co-I Carlos Cruchaga, Profesor Asistente de Psiquiatría, tiene experiencia en la genética humana relacionada a la EA y está bien instruido en el análisis genético complejo incluyendo el innovador análisis de variantes raras propuesto aquí. Tanto VHUH como BJH son centros médicos de tercer nivel con gran concentración de pacientes que admiten cantidades importantes de pacientes con EVCia. Los pacientes (n=3000) rápidamente se registran a ambos lados de los sitios de las series de Replicación propuestos en el objetivo 3.

En resumen, la novedad e importancia de este proyecto reside en la combinación de endofenotipos nuevos e informativos para el ictus, acercamientos genéticos innovadores y una cohorte de pacientes relativamente grande, la cual permita el estudio de variantes, tanto raras como comunes en los desenlaces tempranos del ictus.

C. Enfoque

Visión general del proyecto. El amplio objetivo a largo plazo de nuestra investigación es escindir la compleja arquitectura genética del EVCia, que identificará variantes, genes y vías involucradas en mecanismos de lesión cerebral, con implicaciones potenciales para los tratamientos agudos. La meta específica es identificar variantes comunes o raras de codificación que influyen substancialmente en los desenlaces neurológicos tempranos (Δ NIHSS_{24h}) después del EVCia (Figura 3). Para cumplir esto, usaremos nuestra cohorte preexistente de pacientes con EVCia acumulados en ambas series (n=1000) para el descubrimiento de genes (objetivo 1). Estos 1,000 pacientes son pacientes con EVCia tratados con tPA, fenotipificados para los puntos finales neurológicos tempranos con las muestras de ADN recogidas. Afortunadamente, tenemos acceso a los datos genotípicos a partir del ADNI y WU ADRC (915 sujetos), que están ligados a niveles plasmáticos individuales de 175+ (Myriad RBM, <http://www.myriarmb.com/products-services/humanmap-services/human-discoverymap/>). Muchas de estas muestras son directamente relevantes para los desenlaces neurológicos tempranos después de EVCia (A2M, PAI-1, IL-6 y CRP). Utilizando el WU-ADRC y las agrupaciones de datos de ADNI, nosotros

realizaremos GWAS de las variantes comunes y raras, así como también un análisis basado en genes para encontrar variantes/genes que influyen en los niveles de análisis plasmáticos. Posteriormente, estudiaremos estas variantes para ver si estas influyen en los desenlaces neurológicos tempranos en la cohorte de EVCia Serie Descubrimiento. Durante el periodo de tiempo que dura este trabajo, ambas partes continuarán recolectando y fenotipificando muestras en 3,000 pacientes más para replicación y reclutamiento de los pacientes que fueron tratados con t-PA y los que no (cohorte de replicación). Luego seguiremos las 300 variantes/genes más significativos identificados en los objetivos del trabajo 1 y 2, que muestren hasta este punto al menos un valor nominal de p significativo ($p < 0.05$). Utilizando la cohorte combinada Descubrimiento + Replicación, reconoceremos la arquitectura farmacogenómica del tratamiento con t-PA en pacientes con EVCia. Los resultados de estos 4 parajes proporcionarán datos enriquecedores para próximos estudios, así como, análisis otros fenotipos segados relevantes en el ictus isquémico agudo y entendimiento de las consecuencias funcionales de los genes y variantes identificadas.

Objetivo 1: Realizar estudios de asociación genómica amplia, estudiar las mejorías neurológicas tempranas o los deterioros luego de un ictus isquémico agudo.

Hipótesis y justificación: tanto las variables normales como raras están asociadas con desenlaces neurológicos tempranos después de un EVCia.

- Nuestros datos publicados y los resultados preliminares claramente muestran que existen variantes genéticas implicadas en los desenlaces del ictus. Nosotros utilizaremos un gran tamaño de muestra ($n=1000$), y la tecnología y métodos estadísticos más sofisticados para identificar esas variantes.

Plan de trabajo: generaremos un genoma de amplio genotipo tanto para la codificación de variantes raras y comunes en todas las muestras obtenidas.

- Replicaremos los hallazgos obtenidos de IFIT1, requiriendo una p significativa en el amplio genoma. Luego realizaremos una variante única basado en los genes y en el análisis de la trayectoria para identificar nuevos candidatos génicos y variantes para la recuperación temprana

utilizando datos clínicos de las series de Descubrimiento. Seleccionaremos cada variante y gen, con $p < 1 \times 10^{-3}$. La replicación de estas variantes con los desenlaces neurológicos tempranos será menester del objetivo 3.

Muestras actuales de pacientes: hasta la fecha, hemos recaudado datos de NIHSS y muestras de sangre de 1000 enfermos tratados con t-PA de ambos lados (550 del VHIR y 450 de BJH).

- Las variables demográficas y de tratamiento de estos pacientes se describen en la tabla 4. Las diferencias de la práctica entre estos dos lugares explican un poco la demografía discordante. En VHUH, las prácticas tempranas (reflejadas en estos datos) fueron únicamente para los pacientes con oclusión vascular demostrada con imagen (Doppler transcraneal, TCD) que recibieron tratamiento. Por consiguiente y expresándonos en términos generales, los ictus fueron de mayor gravedad (reflejado por un NIHSS basal mayor). Se deduce que estos pacientes tendían a tener mayor edad, mayor incidencia de fibrilación auricular y mostrar mayores $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$. Utilizando la cohorte combinada en el análisis paso a paso de regresión multivariada preliminar, encontramos que las covariables de mayor significancia para el $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ fueron el NIHSS basal ($R^2 = 0.018$), niveles de glucosa ($R^2 = 0.012$) y edad ($R^2 = 0.009$), lo cual logró explicar el 16% de la variabilidad del ΔNIHSS . Estas variantes se recuperarán e incorporarán en el análisis final.

Tabla 4. Características de la población		
	BJH	VHIR
Numero de muestra total	450	550
Edad	65 (14)	72 (12)
Sexo (mujeres)	43.2%	44.6%
Raza (Áfrico-americanos)	37.7%	0%
NIHSS basal	9.3 (6.2)	14.7 (5.9)
$\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$	1.9 (5.8)	4.4 (6.6)

Tiempo de inicio – aguja	131.8 (51.3)	165.4 (76.1)
PAS basal	153 (21)	154 (27)
PAD basal	82 (14)	83 (17)
Glucosa basal	139 (58)	135 (53)
Fibrilación auricular	25.8%	39.0%
Antiplaquetarios	48.7%	38.7%
Anticoagulantes	4.4%	NR
Estatinas	35.1%	23.2%
Hemorragia sintomática (NINDS)	3.4%	6.3%

Fenotipos: utilizaremos $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ como un rasgo cuantitativo para medir la mejoría o el deterioro después del inicio del ictus.

- Como se discutió anteriormente, los rasgos cuantitativos proporcionan muchas ventajas comparado con los estudios de casos y controles. Tenemos amplia experiencia usando rasgos cuantitativos para estudios genéticos. Nuestros análisis preliminares muestran que el $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ sigue una distribución normal (figura 4), con un amplio margen de cambios clínicos tempranos (la mayoría muestran mejoría). Esta frecuencia de cambios es consistente con los estudios previos. La distribución normal nos permite usar análisis paramétricos, proporcionándonos mayor poder que los análisis no paramétricos, y también consiente la inclusión de covariables en este modelo. En el análisis final, si $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ no sigue una distribución normal, intentaremos utilizar diferentes transformaciones para aproximar la variable a la distribución esperada. Si ninguna de las transformaciones estándar normaliza el $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$, esgrimiremos métodos de permuta para calcular la significancia. Hemos aplicado todas estas alternativas satisfactoriamente en el pasado.

Genotipificación y control de calidad (QC): genotipificación amplia del genoma (variantes raras y comunes).

- Las muestras serán genotipificadas usando el *Affymetrix Axiom Violan Genotyping Array*. Este ensayo incluye más de 350,000 variantes raras codificadas y 246,000 variantes comunes informativas, lo cual permite la reclutación de 5 millones de SNPs comunes. Previo al análisis de asociación o imputación, todas las muestras y genotipos se someterán a un estricto control de calidad (QC). Los datos del genotipo se limpiarán aplicándoles una tasa de llamadas mínimas de SNPs e individuales (98%)

y mínimas frecuencia de alelos menores (MAF= 0.02). La SNPs que no estén en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 1 \times 10^{-6}$) serán excluidas. Los exámenes para duplicados no anticipados y relacionados crípticamente se llevarán a cabo utilizando estimaciones de proporción pares del amplio genoma identificando por descendencia. Para las variantes raras, no se van a quitar SNPs con base en los MAF, porque se espera que la mayoría de las variantes tengan muy bajos MAF.

Imputación:

- El conjunto de 1,000 genomas (realizado desde junio de 2012) y el software de imputación² será utilizada para imputar más de 6 millones de SNPs. Los SNPs con una $R^2 < 0.5$, una frecuencia menor de alelos (MAF) < 0.02 , fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 1 \times 10^{-6}$), una tasa de llamada $< 95\%$, o un puntaje de Gprobs < 0.90 serán retirados. En nuestro GWAS previo y los procesos de imputación un total de 5,815,690 SNPs pasaron el proceso QC.

Almacenamiento de datos y manejo:

- Hemos desarrollado métodos eficientes y efectivos para el manejo de SNP, incluyendo control de calidad, limpieza, anotación y análisis. Estos protocolos se han utilizado en nuestra extensa escala GWAS para otros fenotipos.

Estructura de población:

- Dada la disponibilidad de los datos GWAS, Eigenstrat nosotros la utilizaremos en las muestras junto con las muestras de HapMap como anclas para confirmar el auto reporte de raza/etnicidad. Los tres primeros factores componentes principales (PCs) para el análisis de estratificación de la población serán incluidos en las covariables del análisis.

Análisis estadístico:

- $\Delta \text{NIHSS}_{24\text{h}}$ se pondrá a prueba para las desviaciones significativas desde la distribución normal utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Si esto se desvía de la normalidad, los datos serán transformados y evaluados otra vez desde el inicio para su normalidad. El análisis de discriminación paso a paso se realizará utilizando valores normales para determinar que covariables deben incluirse en cada modelo. Con base en los análisis preliminares, el NIHSS basal, sitio, niveles de glucosa, edad y el factor componente principal para la estratificación de la población deberán ser

incluidos como covariables. Debido a que nosotros esperamos tener al menos tres poblaciones diferentes en nuestro conjunto de datos: Los Europeo-Americanos (EA), Áfrico-americanos (AA) y los españoles, nosotros realizaremos el análisis para cada población independientemente (combinando los valores de p por meta análisis, utilizando METAL, <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/metal/>). Luego, los valores de p para la unión y el meta análisis se comparará. En nuestros resultados preliminares, los cuales incluyeron EA y AA, la unión y meta análisis mostró resultados de p similares, tanto para las variables únicas como para los análisis basados en los genes. En caso de discordancia entre los valores de las variables de p, usaremos el abordaje más conservador, en este caso el meta análisis.

- Análisis de variables únicas: usaremos PLINK para analizar la asociación entre las variables genéticas (en un modelo aditivo) y el $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ normalizado, incluyendo covariables significativas.
- Análisis basado en los genes: Nosotros solamente tenemos poder para identificar las asociaciones significativas del genoma ampliado para aquellas variantes con gran tamaño de efecto. Para acomodar el efecto de las variantes raras con tamaño de efecto moderado, nosotros usaremos modelos estadísticos novedosos que se han desarrollado para analizar la asociación con raras variantes. Brevemente, los métodos basados en los genes colapsan las raras variantes dentro de una región a una única variante y luego evalúan la asociación entre las raras variantes dentro de una región y rasgo de interés. Utilizaremos la prueba de asociación secuencial de kernel (SKAT-O) para evaluar la asociación entre $\text{dNIHSS}_{24\text{h}}$ y las raras variantes dentro de una región génica. A ventaja de SKAT-O por sobre los otros métodos con base genómica es que SKAT puede dar cuentas para variantes cuyos efectos en direcciones diferentes dentro del mismo gen y ajustar las covariables confusoras.
- Análisis de la trayectoria: usaremos el ALIGATOR para identificar los términos de ontología genómica (GO) y la enciclopedia Kyoto de trayectorias enriquecidas de genes y genomas (KEGG) por SNPs con asociaciones significativas. Este método hace un análisis de sobre representación, evalúa la significancia de cada categoría de genes

mientras que se corrige por el tamaño de los mismos, el número de SNPs genotificado por gen, la sobreposición de genes y el vínculo de desequilibrio potencial ($p < 1.0 \times 10^{-4}$). El proceso de poda de los SNPs en el vínculo de desequilibrio se lleva a cabo por medio de la consideración de solamente los SNPs más significativos entre el resto de SNPs que tienen $r^2 > 0.1$ y están dentro de 1Mb. La significancia de cada término y cada trayectoria se calcula comparando el número de genes significativos con el número de genes esperado por casualidad. Para este propósito, el algoritmo genera 5,000 series de genes seleccionando al azar SNPs hasta conseguir un listado de genes etiquetados. El exceso de conjuntos génicos significativamente sobre representados es calculado por la aplicación de un método de remuestreo (1,000 permutas).

- Estratificación de la población: en todos los análisis, analizaremos los individuos EA, AA y españoles por separado para evitar asociaciones espurias. Luego usaremos METAL para combinar los valores de p. A pesar de que las poblaciones se analizarán por separado, Los PCs serán incluidos para corregir cada análisis de una potencial población sub estratificada.

Poder de los cálculos:

- Las metas de este objetivo son replicar la asociación de IFIT1 e identificar nuevas variables candidatas y asociaciones génicas asociadas con $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$.
- Genes y replicación IFIT1: para determinar el poder de replicación IFIT1 en la significancia del amplio genoma para la asociación con $\Delta\text{NIHSS}_{24\text{h}}$ e identificación de genes adicionales, utilizamos la función “Poder Logístico” en la librería R SKAT-O con el fin de estimar la potencia del método de asociación de una carga de conjuntos genéticos en una secuencia rara de datos. Uso de $n=1000$, a delta (la diferencia entre grupos significa en unidades de SD) que van desde 1.5 a 3.0 (delta=2.3 para IFIT1), y en conjunto con la frecuencia de alelos de 0.5-5%, el α fue ajustada a 5×10^{-6} , para una corrección de Bonferroni genómica amplia general. Con base en este análisis, tenemos suficiente potencia para replicar IFIT1 y 80% de potencia para detectar los efectos sobre deltas de 1.70 para genes con raras frecuencias acumulativas de 1% (tabla 5). La

potencia para genes específicos dependerá en el tamaño de gen, la codificación de variables por gen y la dirección del efecto de cada variante.

Tabla 5. Poder de replicación IFIT1, n=1000, p=5x10 ⁻⁶					
Delta (en unidades de desviación estándar)					
MAF	1.50	1.75	2.00	2.50	3.00
5%	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
4%	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
3%	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
2%	0.97	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
1.7%	0.87	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
1%	0.55	0.81	0.95	>0.99	>0.99
0.5%	0.11	0.248	0.44	0.83	0.92

- Raras variantes: con base en estudios previos y otros estudios farmacogenéticos, nosotros esperamos que las variantes raras codificadas tendrán un mayor tamaño de efecto que las variantes comunes. Por esta razón nosotros corrimos la potencia del análisis en rangos delta de 1.5 a 3.5, α ajustada a 5×10^{-8} (tabla 6). Tenemos 80% de poder para detectar los efectos de las variantes con MAF de 1% y por deltas de 2.1, o MAF de 0.5% y delta=2.85. Nosotros no tendremos poder de identificar una asociación significativa con variantes con frecuencia de alelos muy bajas (comunes y raras) y genes, mostrando al menos un valor nominal de p ($p < 0.05$) en el objetivo 3.

Tabla 6. Poder de las variantes raras, n=1000, p=5x10 ⁻⁸						
Delta (en unidades de desviación estándar)						
MAF	1.50	1.75	2.00	2.50	3.00	3.50
1%	0.22	0.51	0.78	0.99	>0.99	>0.99
0.5%	0.02	0.06	0.13	0.53	0.88	0.98
0.25%	0.00	0.00	0.01	0.03	0.10	0.20

- Variantes comunes: este análisis se corrió utilizando deltas en rango de 0.3 a 1, y varias MAFs. Alfa fue ajustada a 5×10^{-8} . Nosotros tendremos 80% de potencia para detectar efectos en donde delta sea igual a 0.45 para las variantes con una MAF=0.30. Nosotros también tendremos potencia para identificar asociaciones significativas de genoma amplio para variantes con una MAF menor a 10%, pero tendremos suficiente poder para identificar estas variantes en el objetivo 3.

Tabla 7. Poder de las variantes comunes, n=1000, p=5x10⁻⁸						
Delta (en unidades de desviación estándar)						
MAF	0.30	0.40	0.50	0.60	0.80	1.00
30%	0.12	0.62	0.95	>0.99	>0.99	>0.99
15%	0.01	0.16	0.56	0.89	>0.99	>0.99
5%	<0.01	0.01	0.02	0.10	0.51	0.91

Anticipación de resultados y trampas:

- La potencia del análisis indica que debemos ser capaces de replicar IFIT1, e identificar nuevas variantes y genes candidatos. Nosotros esperamos que las variantes de codificación raras mostraran un efecto muy fuerte en los desenlaces tempranos – suposición razonable dados los resultados de estudios previos que muestran variantes raras con efecto de gran tamaño para los rasgos complejos -. Sin embargo, debido a nuestro tamaño de muestra limitado, muchas de las variantes caerán en un rango con valores de p sugestivos ($P=1.0 \times 10^{-5}$ a 1.0×10^{-7}). La identificación de señales reales de aquellas con error de tipo I es difícil en este grupo. Nosotros proponemos un abordaje innovador para identificar aquellas variantes, utilizando biomarcadores plasmáticos (A2M, PAI-1, IL-6 y CRP) y sus endofenotipos para desenlaces tempranos. Haremos identificación cruzada de variables candidatas con significancia limítrofe, utilizando endofenotipos biológicamente significativos. Hemos usado satisfactoriamente este abordaje para algunas otras enfermedades complejas. También planeamos usar un conjunto de datos independientes de replicación para identificar signos adicionales reales para el análisis de Descubrimiento.
- Trampas: Mientras que la fenotipificación basada en la etiología es importante para el entendimiento de las asociaciones genéticas que involucran el riesgo de ictus, aún no está claro si la etiología es importante para los desenlaces neurológicos tempranos. Los estudios terapéuticos sugieren que la etiología no es importante en los desenlaces después del tratamiento. Independientemente, nosotros tenemos datos con base en la etiología (criterios de TOAST), y estos pueden determinar si la etiología altera las influencias genéticas del resultado final.

Estudios futuros:

- Si la asociación entre IFIT1 y los desenlaces neurológicos tempranos se confirman en este objetivo, nosotros realizaremos una serie de estudios en modelos animales para examinar el papel funcional de IFIT1 en la lesión cerebral aguda. Hemos encontrado que los ratones con “*knockout*” de IFIT1 han sido recientemente desarrollados en la Universidad de Washington en el laboratorio del Dr. Michael Diamond, un virólogo con experiencia en las respuestas inmunes del huésped. Él ha encontrado que los ratones con KO del IFIT1 pueden tener deficiencias en los mecanismos de la barrera hematoencefálica (BHE) para controlar infecciones virales en el cerebro, y nosotros creemos que estos mecanismos también son relevantes para las lesiones cerebrales secundarias a isquemia focal. El Dr. Diamond ha estado de acuerdo en proporcionarnos ratones para hacer estudios de isquemia cerebral focal. Aunque fuera del alcance de esta subvención, nos estamos preparando para impulsarnos hacia adelante con estos estudios funcionales utilizando otros mecanismos de financiamiento. Otras asociaciones de genoma ampliado confirmadas en las series de Replicación también serán llevadas a cabo con cualquier medio disponible (ensayos con base celular, modelos de ratones, etc.). Ambos PI’s tienen experiencia en abordajes experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* que serán importantes para el entendimiento de los efectos funcionales de los hallazgos genéticos.

Objetivo 2: Determinar cuáles de las variantes genéticas que modulan los niveles de análisis plasmáticos relevantes para la patogénesis del EVCia influyen en los desenlaces neurológicos tempranos.

Hipótesis y justificación: El GWAS impone umbrales muy estrictos de valores de p. La mayoría de los estudios genéticos sugieren que algunas de las señales con valores de p sugestivos son reales (1×10^{-5} a 1×10^{-7}), pero la identificación de estas verdaderas señales permaneces oscurecidas por el ruido de fondo. Por consiguiente, existe la necesidad de enfoques innovadores y alternativos para identificar las señales reales entre aquellos con valores de p significativas. Nosotros hipotetizamos que esas variantes asociadas con niveles plasmáticos

de proteínas directamente involucradas en la patogénesis del ictus también se asociarán con desenlaces tempranos después del EVCia. En consecuencia, por medio de la identificación de aquellas variantes/genes que influyen en los niveles de estas proteínas plasmáticas, nosotros seremos capaces de identificar variantes adicionales que influirán en los desenlaces tempranos pero que no pasan los umbrales significativos de todo el genoma. Esta hipótesis está sustentada por nuestra información (Montaner): un A2M SNP (Val1000Ile) modifica los niveles séricos de A2M y muestra fuerte asociación con desenlaces tempranos ($p < 3.57 \times 10^{-4}$).

Hemos utilizado un abordaje similar en estudios genéticos relacionados con la Enfermedad de Alzheimer (EA). Los niveles del LCR de proteína tau y fosfo-tau (ftau) de 1,200 casos de pacientes con EA y controles fueron utilizados para crear GWAS. Cuatro (tres nuevos) loci significativos del genoma completo fueron identificados a partir de la búsqueda de tau y ftau del LCR: rs9877502 ($P = 4.89 \times 10^{-9}$ para tau) localizado en 3q28 entre GEMC1 y OSTN, rs514716 ($P = 1.07 \times 10^{-8}$ y $P = 3.22 \times 10^{-9}$ para tau y ftau, respectivamente), localizados en 9p24.2 dentro GLIS3 y rs6922617 ($P = 3.58 \times 10^{-8}$ para ftau en LCR) en 6p21.1 dentro del racimo génico TREM, región recientemente reportada que alberga raras variantes que incrementan el riesgo de EA. En algunos conjuntos de datos independientes, rs9877502 mostró fuerte asociación con el riesgo de EA, patología intricada y deterioro cognitivo global ($P = 2.67 \times 10^{-4}$, 0.039, 4.86×10^{-5} , respectivamente). Uno de los loci génicos del genoma completo (APOE) para tau del LCR es conocido como factor de riesgo para desarrollar EA. Además, los otros loci del genoma estuvieron también asociados con riesgo de EA, a pesar de que ellos no alcanzaron significancia genómica en estudios extensos independientes para el riesgo de EA. Estos resultados ilustran claramente como los rasgos intermedios pueden ayudar a identificar señales verdaderas de éxitos del GWAS con valores sugerentes de p.

Plan de trabajo: Utilizando conjuntos de datos preexistentes unidos a las medidas de análisis plasmáticos (*Human DiscoveryMap*) proveniente de la Iniciativa de Neuroimagen para la Enfermedad de Alzheimer (ADNI) y del ADRC de la Universidad de Washington ($n = 915$), nosotros realizaremos GWAS para identificar variantes que influyan en los niveles de análisis plasmáticos relevantes para la patogenia del EVCia (p.ej.: A2M, PAI-1, IL6 y PCR). Nuestros estudios

más recientes, han demostrado que los niveles plasmáticos de A2M, PAI-1 y PCR están asociados con desenlaces tempranos del EVCia (morbilidad y mortalidad). Análogamente, algunos otros estudios han unido los niveles plasmáticos de IL-6 con la gravedad del ictus y el deterioro neurológico. Utilizando los conjuntos de datos de WU-ADRC y ADNI, nosotros realizaremos GWAS con base en el análisis para encontrar genes que influyen estos niveles de análisis plasmáticos. Posteriormente, evaluaremos estas variantes/genes para mirar si estas influyen en el desenlace neurológico temprano en nuestra serie Descubrimiento de EVCia.

Conjunto de datos y fenotipos: Fueron medidos niveles plasmáticos de 183 proteínas en un total de 915 individuos de WU-ADRC y ADNI utilizando *Human DiscoveryMap (Myriad RBM)*. Ambos son estudios longitudinales que se enfocan en la identificación y caracterización de los eventos patológicos en la EA. Setenta por ciento de los individuos WU-ADRC y 12% de los ADNI son individuos viejos sanos (tabla 8).

Tabla 8. Muestras demográficas WU-ADRC y ADNI					
	Estudio	Muestra #	Edad	Hombres	APOE
			(rango)	(%)	ε4+ (%)
WU - AD RC	Controles	239	71±7 (53-91)	35	32
	AD	100	74±7 (53-90)	46	42
AD NI	Controles	85	76±5 (62-92)	50	24
	AD	481	75±6 (57-89)	66	57

La edad representa los años que tenía el paciente en el momento de la punción lumbar

Las características epidemiológicas de estas muestras están publicadas. De las 183 proteínas plasmáticas medidas en cada uno de los sujetos, identificamos varias que son conocidas como predictores de desenlaces neurológicos tempranos después del EVCia (A2M, PAI-1, PCR, IL-6). La tabla 9 muestra una comparación de niveles plasmáticos para evaluar las diferencias entre los casos y los controles – no se encontraron diferencias significativas, permitiéndonos utilizar ambos grupos para mirar asociaciones genéticas con niveles (no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de WU-ADRC y ADNI). Para los cuatro análisis, hay hasta más de 10 veces de diferencias en los niveles plasmáticos entre los individuos, y niveles que se aproximan a una distribución normal posterior a una transformación-log.

Tabla 9. Niveles plasmáticos similares entre AD y los controles			
	Controles	Casos AD	Valor de p
A2-Macroglobulina (mg/ml)	1.18 ± 0.64 (0.73-6.5)	1.17 ± 0.23 (0.63-2.6)	0.80
PAI-1 (ng/mL)	60.2 ± 38.3 (12-190)	55.8 ± 41 (7-500)	0.37
IL-6 (ng/mL)	3.31 ± 1.83 (1.2-12)	3.76 ± 3.43 (1.1-35)	0.41
PCR (ug/mL)	3.19 ± 4.35 (0.17-22)	3.23 ± 6.95 (0.10-52)	0.95

Datos GWAS: Los datos GWAS de las muestras WU y ADNI están listas y a la mano. La genotipificación se realizó utilizando Illumina 610 o los arreglos de genotipificación OmniExpress. Todas las muestras y genotipos fueron sometidos a QC estricto previo a la imputación.

Análisis estadístico: Los análisis basados en una sola variante y en los genes serán realizados como los describimos en el objetivo 1. Con base en nuestro análisis preliminar, los niveles plasmáticos de A2M, PAI-1, PCR e IL-6 seguirán una distribución normal después de la transformación-log. Más del 95% de los individuos en los grupos de ADNI y WU-ADRC con análisis plasmáticos son EA. El 5% restante son AA. Utilizaremos métodos de estratificación poblacional, los sujetos AA no estarán incluidos en este análisis. En cualquier caso, los tres factores componentes principales dentro de EA estarán incluidos como covariables. A pesar de que nosotros no veremos diferencia en los valores absolutos de estas proteínas plasmáticas entre los casos y controles de la

Enfermedad de Alzheimer, analizaremos si las asociaciones de alguna variante en particular con niveles de proteínas dependen del estado de la EA. Para hacer esto, consideraremos los casos de EA y los controles por separado y compararemos el tamaño del efecto (β). Si la asociación no depende del estado, nosotros esperamos encontrar tamaños de efectos similares en ambos grupos. También agregaremos el estado clínico como una covariable para la corrección de efectos potenciales dependientes del estado. Por último, únicamente seguiremos las variantes en los cuales, los efectos son independientes del estado clínico de la enfermedad.

Poder de los cálculos: hemos realizado previamente el análisis GWAS para varios niveles de proteínas plasmáticas utilizando el *Human DiscoveryMap* en los datos ADNI y WU-ADRC. En todos los casos encontramos valores de p extensamente significativos y extremadamente amplios con relación al genoma completo. Por ejemplo, el GWAS para los niveles plasmáticos de APOE revelaron rs2075650, los cuales etiquetan el genotipo APOE, pasando a todo el genoma en importancia ($p= 1.91 \times 10^{-17}$). También realizamos GWAS para los niveles plasmáticos de IL-6, y encontramos muchas variantes en el gen IL6R con fuerte asociación con los niveles de la proteína IL6R. Las variantes sin sentido rs2228145 estuvieron asociadas con niveles plasmáticos mayores de la proteína IL6R (conjunto de datos combinados WU-ADNI, $p=5 \times 10^{-100}$). Otros estudios de GWAS han reportado que estos o valores de SNP correlacionados más alto también están asociados con niveles plasmáticos de PCR (<http://www.genome.gov/gwastudies>). En ambos casos la asociación de SNPs con los niveles plasmáticos son independientes del estado de la enfermedad. Estos resultados muestran que este conjunto de datos tiene poder suficiente como para encontrar las señales significativas del amplio genoma. El poder del análisis (Fpower, SAS) fue hecho utilizando valores delta en rango de 0.1 a 1 (el delta encontrando en nuestros estudios preliminares), y varios MAF. El poder para identificar los genes significativos de todo el amplio genoma y sus variantes serán similares a aquellos cálculos realizados en el objetivo 1, porque el tamaño de muestra es parecido.

Asociación con la recuperación después del ictus: Nosotros únicamente seleccionamos las variables del loci significativas de toda la extensión genómica estudiada o aquellos con valores de p más significativos que 1×10^{-6} en relación

con las proteínas plasmáticas. Luego, analizaremos si aquellas variantes/genes también muestran asociación con Δ NIHSS_{24h} en nuestra *Discovery Series* de EVCia para obtener una $p < 1 \times 10^{-3}$.

Resultados anticipados y trampas: Este objetivo evaluará la hipótesis de que estos análisis plasmáticos (A2M, PAI-1, IL-6 y PCR) influyen directamente en los desenlaces tempranos. El poder de los análisis y nuestros estudios previos indican que debemos ser capaces de identificar variables genéticas asociadas con niveles plasmáticos de A2M, PAI-1, PCR e IL-6 a nivel genómico. Nuestros estudios previos también mostraron que estas variables también pueden afectar la recuperación temprana luego de ictus. Esperamos que utilizando estos niveles séricos plasmáticos como endofenotipos intermedios para los desenlaces tempranos del ictus, seremos capaces de recuperar algunas de estas señales perdidas, para el uso tradicional significativo del amplio y estricto genoma ampliado con base en los acercamientos del GWAS. Una de las trampas potenciales es que la asociación de las variantes genéticas con niveles plasmáticos de proteínas, pueden ser dependientes del estado de la enfermedad y, por lo tanto, aquellas variables no jugarán un papel fundamental en la recuperación del ictus. Hemos perfilado un conjunto de análisis estadísticos para analizar si la asociación es dependiente del estado de la enfermedad, y únicamente daremos seguimiento a la asociación que no depende del estado de la misma.

Objetivo 3: Replicando las asociaciones del amplio genoma, nosotros evaluaremos los genes y variantes candidatos en una cohorte independiente de pacientes con EVCia.

Plan de trabajo: En el primer año de este trabajo, nosotros planeamos reclutar más pacientes con EVCia, recolectando sus muestras de sangre y plasma para estudios genéticos y futuras ilustraciones proteómicas. Nosotros recogeremos una batería extensa de fenotipos: mortalidad de los pacientes hospitalizados, transformación hemorrágica, recanalización (monitoreo TCD), edema cerebral (evaluado con tomografías y/o resonancias magnéticas de control (TC, IRM, respectivamente)), o ruptura de la BHE (IRM con gadolinio) entre otras muestras que se podrán ir obteniendo a lo largo de este estudio y otros estudios siempre

y cuando estén relacionadas con ictus. EN total, reclutaremos 3,000 personas en el estudio. Las 300 variantes más prometedoras que se identifiquen en la Serie de Descubrimiento (objetivos 1 y 2), serán genotipificadas y analizadas en esta serie de replicación independiente. También realizaremos un análisis en conjunto de ambas series, de Replicación y de Descubrimiento (n= 4000). *Para las asociaciones del genoma completo, requeriremos que las variantes/genes muestren un valor de p significativo ($p < 0.05$) en ambas series en la misma dirección y en el análisis de conjunto deberán mostrar significancia en el amplio genoma ($p < 5 \times 10^{-8}$ para las variantes sencillas y 5×10^{-6} para los estudios con base génica).*

3a; Cohorte de replicación: Estaremos inscribiendo pacientes adicionales con EVCia en el estudio para ambos lados (VHUH y BJH). Todos los pacientes con EVCia presentes en los hospitales, cumpliendo criterios de inclusión (tabla 10) para el estudio, serán registrados en el trabajo. Una vez que se obtenga el consentimiento informado, se tomará una muestra de sangre de los sujetos y se almacenará. Se registrará el NIHSS en el momento inmediato de su llegada al hospital (dentro de las primeras 6 horas de iniciados los síntomas) y 24 horas después del inicio. Si el paciente continúa en el hospital, se deberá realizar NIHSS adicional dentro de las próximas 48 a 72 horas y en el momento del egreso. Tanto los pacientes tratados con tPA intravenoso (tPA IV) como los no tratados serán incluidos en el estudio, sin embargo, los pacientes que sean tratados con trombolisis intrarterial o trombectomía serán excluidos (tabla 10).

Tabla 10. Criterios de selección para los pacientes
Criterios de inclusión:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ictus isquémico 2. Edad ≥ 18 años 3. Llegada al hospital dentro de las 6 primeras horas del inicio de los síntomas del ictus 4. Déficit neurológico medible 5. Tratados con tPA IV de 0-4.5 horas (ventana) o no tratados con tPA IV
Criterios de exclusión:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Incapacidad para conseguir el consentimiento informado 2. Incapacidad para conseguir muestra de sangre 3. Tratamiento con tPA intrarterial o trombectomía

Recopilación de datos: los datos demográficos, de la historia clínica y la exploración física serán recopilados por los coordinadores de la investigación,

incluyendo edad, sexo, raza, día y hora del ictus, tratamiento recibido, hora de inicio del tPA, eventos cerebrovasculares previos (AIT/EVC isquémico), historia vascular previa (hipertensión, diabetes mellitus, hiperlipidemia, fibrilación auricular, consumo de tabaco y cardiopatía isquémica), estudios de laboratorio (biometría hemática, tiempos de coagulación, glucosa, electrolitos, perfil de lípidos) y medicamentos concomitantes. También se registrará el curso hospitalario de los pacientes y de las complicaciones (infecciones, deterioro neurológico, transformación hemorrágica (TH)), y de las intervenciones hospitalarias (tratamiento con soluciones hipertónicas, craneotomía, ventilación mecánica). Los resultados del cuidado estándar (standard-of-care {SOC}) el diagnóstico por imagen (TC, IRM, ultrasonido (US) y ecocardiograma (ECO)) también serán capturados. La etiología del evento se realizará por medio de la clasificación de TOAST y se recolectará la información al momento del egreso hospitalario.

Evaluaciones clínicas: la evaluación inicial del paciente se realizará como parte de la rutina del SOC proporcionada por el servicio de Vascular. Esto incluye: NIHSS basal, una parte integral de la evaluación clínica inicial por parte del equipo que conforma el Código Ictus que tiene cabida en el servicio de urgencias. La evaluación de los NIHSS subsecuentes serán realizados por el coordinador del proyecto, quien ha sido entrenado extensamente para la aplicación de esta escala, en los tiempos especificados previamente.

El NIHSS es una escala de 42 puntos que cuantifica el déficit neurológico en 11 categorías, y es reproducible entre los clínicos e investigadores. Tres meses después del ictus se deben obtener las siguientes escalas y la siguiente información del paciente estudiado: NIHSS, mRS, evolución durante la hospitalización y rehabilitación por externo, intervalo de hospitalización, ictus recurrente y, en caso posible, información que brinde la familia acerca de su muerte.

Panorama de la población de pacientes con ictus.

- *Hospital Universitario Vall d'Hebron (VHUH):* es un hospital-escuela que consta de 1400 camas y es un centro de referencia para la investigación biomédica (VHIR) en Barcelona, España. La admisión de pacientes con EVCia y su respectivo tratamiento desde 2012 se muestra en la tabla 11. Además de la fenotipificación clínica, el VHUH rutinariamente realiza

imagen vascular con base en el ultrasonido doppler transcraneal (DTC) por al menos dos horas en todos los pacientes que han sido tratados con tPA como parte del SOC. Esta valiosa información proporcionará visualización directa de la oclusión vascular y el estado de recanalización en todos los pacientes tratados con tPA IV.

- *Barnes-Jewish Hospital (BJH)*: es un hospital de enseñanza sin fines de lucro de 1228 camas afiliado a la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington en St. Louis, MO. La admisión de pacientes desde 2012 con EVCia y el tratamiento recibido también se muestra en la tabla 11. Este hospital es referencia de tercer nivel, y es el centro de una red de hospitales localizados a través de Missouri/Illinois. Los médicos encargados de los servicios de emergencia dentro de la red de hospitales de la BJC están entrenados para la evaluación aguda y tratamiento de los pacientes con EVCia y certificados para realizar el NIHSS, el cual es realizado en todos los candidatos a tratamiento con tPA IV. De los 161 pacientes tratados, 85 fueron tratados en hospitales de referencia e inmediatamente transferidos a hospitales BJH.

Tabla 11. Características hospitalarias, EVCia		
Enero – diciembre, 2012	VHIR, España	BJH, EUA
# Camas	1400	1228
# Ictus isquémicos	1028	854
# EVCia (llegaron en las primeras 6 horas)	641	283
# tPA IV solamente	135	161
# Intervenciones intrarteriales	47	31

Con base en los datos más recientes y las tasas de reclutamiento previas (70%) en ambos sitios, nosotros anticipamos que seríamos capaces de reclutar 600 paciente por año (tratados con tPA o no tratados). *Por tanto, durante el periodo de concesión de 5 años, estimamos que acumularíamos 3,000 muestras de pacientes con EVCia fenotípicamente de nuestra Serie de Replicación.*

Colección del biorepositorio, extracción y almacenamiento: Posterior al consentimiento informado, se recolectarán 10 ml de sangre por uno de los

coordinadores del estudio y la muestra será etiquetada con la fecha y la hora, así como con el nombre del paciente, año de nacimiento y será enviada a uno de los laboratorios, ya sea con el Dr. Israel Cárdenas (VHIR) o el Dr. Carlos Cruchaga (Universidad de Washington), en donde serán identificadas con un número único de biorepositorio el cual será vinculado a la fecha de recolección de la muestra. Se recogerán capas blanquecinas; Se extraerá el ADN de cada una de las muestras. El ADN de alta calidad y alto peso molecular será almacenado a 70°C. Las muestras de ADN del VHIR serán transportadas hacia la Universidad de Washington y se registrarán en una base semi-anual.

Manejo del conjunto de datos: los datos recolectados prospectivamente, como describimos antes, entrarán a una base de datos protegida con contraseña controlada por los coordinadores de la investigación. Los datos serán revisados a través de un control de calidad contra las fuentes primarias y monitorizadas de forma cercana por la Dra. Heitsch (WU) y el Dr. Fernández-Cárdenas (VHIR). Las contraseñas anónimas encargadas de proteger los datos de los pacientes del VHIR serán enviadas vía correo electrónico con cada envío del ADN semi-anual, y se fusionarán con datos de la WU des identificados por la Dra. Heitsch.

Próximos estudios: Además de la fenotipificación de los pacientes con EVCia para los primeros criterios neurológicos pertinentes para el presente estudio (DNIHSS_{24h}), estamos caracterizando otros endofenotipos: mortalidad en pacientes hospitalizados, transformación hemorrágica, recanalización (DTC), edema cerebral (TC y/o IMR), disrupción de la BHE (IRM con gadolinio) y desenlaces a largo plazo (NIHSS y mRS a los 90 días). Mientras que fuera del alcance de esta concesión, nosotros esperamos tomar ventaja de esta prolífica base de datos para examinar las influencias genéticas en estos importantes desenlaces en el futuro.

3b; Replicación del amplio genoma: las 300 variantes con mayor significancia de los objetivos 1 y 2 serán genotipificadas en estas 3,000 muestras más. Nosotros realizaremos el mismo análisis que en el objetivo 1. Para que sea considerado como significativo, requeriremos que las SNP/genes muestren asociación demostrativa en las Series de Replicación con una $p < 0.05$ y en el metaanálisis (*Discovery* + Replicación) muestre una p significativa del genoma ampliado.

Análisis estadístico: análisis de variante única, con base génica y de las vías serán realizadas en el objetivo 1. EL conjunto de datos de Replicación incluirá a los pacientes tratados con tPA y a los pacientes no tratados. En nuestro análisis discriminativo de paso a paso, circunscribiremos a los pacientes tratados con tPA y el tiempo de tratamiento como covariables potenciales. Si es significativo, las agregaremos a este modelo. El análisis de los efectos dependientes del tPA y sus interacciones serán analizadas en el objetivo 4. Debido a que no tenemos datos genotípicos del amplio genoma, no somos capaces de incluir a los factores principales que componen la estratificación de la población como covariables de este modelo. Con el fin de evitar asociaciones espurias debido a la estratificación de la población, realizaremos análisis independiente dentro de cada población (AA, EA y españoles) y los valores de p serán combinados por METAL.

Candidatos a la secuenciación de genes: Los mejores 1-3 genes y más prometedores con base en los resultados previos serán secuenciados profundamente para identificar códigos adicionales con efecto de gran tamaño y que no estén incluidos en los arreglos de genotipificación. Secuenciaremos 4,000 muestras. Usaremos el protocolo desarrollado por Vallania et.al., el cual hemos utilizado satisfactoriamente ocasiones atrás. Este método combina técnicas de biología molecular y análisis computacionales para lograr la resecuenciación etiquetada y la detección de variantes poco comunes. Todas estas variantes identificadas por el método de agrupación del ADN que será validado por medio de genotipificación directa.

- Anotaciones y bioinformática del método de ADN combinado: hemos desarrollado varios guiones de Perl para analizar si las variantes de sucesión se encuentran en código secuencial (sinónimos o no sinónimos), regiones de intrones, o sitios de empalme. También utilizaremos las herramientas bioinformáticas para identificar el potencial deletéreo de las variantes no sinónimas. Una vez que la secuencia de datos sea analizada, genotipificaremos todas las SNPs identificadas para confirmar que todas ellas son reales y para identificar las portadoras de las SNPs específicas.
- Análisis estadístico de la resecuenciación de datos: las nuevas variantes identificadas serán incluidas en el análisis de variante única y en el de base genómica.

Fuerza de los cálculos: en estudios previos, hemos identificado varios éxitos significativos del amplio genoma en pequeños conjuntos de datos (n=1300) utilizando rasgos como endofenotipos. Con 4,000 muestras seremos capaces de encontrar muchas asociaciones significativas dentro del genoma. La fuerza de los cálculos se realizó como se muestra a continuación:

- Variantes comunes: tendremos gran potencia para identificar variantes significativas asociadas con el genoma ampliado, aún con tamaños pequeños de muestra (delta <0.30).
- Variantes raras: como en el caso de las variantes comunes, con 4,000 muestras obtendremos suficiente poder para identificar la baja frecuencia de las variantes que se presenten en el genoma ampliado con un tamaño de muestra mediano o grande.
- Análisis con base en el genoma: para el análisis basado en el genoma (SKAT-O) tendremos mayor poder que en el análisis de variante única, por tanto, seremos capaces de analizar todas las variantes independientemente del MAF (tabla 12).

Tabla 12. Poder del análisis de las variantes raras y comunes y análisis con base génica, n=4000, $\alpha=5 \times 10^{-8}$

Delta (en unidades de desviación estándar)							
MAF	0.20	0.50	0.60	0.80	1.00	1.50	3.00
30%	0.63	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
15%	0.17	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
5%	0.01	0.92	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
2.5%	0.01	0.30	0.68	0.99	>0.99	>0.99	>0.99
1%	0.01	0.02	0.05	0.33	0.80	>0.99	>0.99
0.5%	<0.01	<0.01	0.01	0.03	0.15	0.89	>0.99
0.25%	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Fallos y abordajes alternativos: Con base en nuestros estudios preliminares y nuestro poder de cálculo esperamos encontrar nuevas variantes y genes asociados con los desenlaces tempranos del ictus en un nivel genético. Se necesitará la caracterización funcional para entender por completo el mecanismo biológico subyacente de estas asociaciones y traducir estos hallazgos al escenario clínico. De cualquier modo, como no podemos prevenir que

variantes/genes vamos a encontrar, somos incapaces de proponer experimentos funcionales específicos que se necesitarán para caracterizar aquellos mecanismos. Evaluaremos el mejor acercamiento que es necesario para cada variante/gen, una vez identificado. En este objetivo seremos incapaces de determinar si las asociaciones con los desenlaces neurológicos tempranos son dependientes de tPA o independientes. El objetivo 4 abordará esta pregunta.

Futuros estudios: en este estudio no esperamos encontrar todas las señales genómicas significativas debido a que solamente seguiremos las 300 variantes más representativas encontradas en los primeros dos objetivos. De tal suerte, es probable que nosotros desechemos las señales reales. Nosotros generaremos datos completos genotípicos de todas las muestras de Replicación si es que somos capaces de obtener fondos adicionales para que logremos correr el GWAS con todas las 4,000 muestras. También estamos trabajando con otros grupos que potencialmente añadirán datos adicionales. Como miembros del Consorcio Genético de Ictus (ISGC, <http://www.strokegenetics.com/>), nosotros reclutaremos a otros sitios para que se unan a la genotipificación para los desenlaces tempranos después del EVCia. El ISGC tiene un enorme trayectoria de colaboración y ha participado en varios estudios de replicación.

Objetivo 4: Determinar que variantes están asociadas con los desenlaces neurológicos tempranos en los pacientes tPA dependientes

Hipótesis y justificación: Estimamos que el 35% de los pacientes con EVCia en la Serie de Replicación reciben tPA; por lo tanto, alrededor del 50% de la unión entre la serie *Discovery* y Replicación recibirán tPA. Nosotros hipotetizamos que algunas de nuestras asociaciones genéticas identificadas en el GWAS descrito en el objetivo 3 serán dependientes de tPA mientras que las otras serán independientes. También especulamos que puede haber variantes genéticas que interactúan con el tratamiento con tPA, las cuales pueden no estar detectadas en nuestro GWAS como está demostrado en el objetivo 3.

“Epítasis” es un término frecuentemente utilizado para las interacciones gen por gen (G x G). Sin embargo, algunos utilizan el término para referirse ampliamente a cualquier tipo de contexto que depende del efecto o para describir tipos muy específicos de las dependencias del contexto. En nuestro caso, los efectos dependientes del contexto pueden también ser clasificadas como interacción de

los genes por el ambiente (G x E), en donde el “ambiente” es el tratamiento o la ausencia del mismo con tPA. Las interacciones mecánicas verdaderas pueden contribuir con efectos marginales o aditivos de los loci individuales, pero puede mostrar grandes efectos aditivos o epistáticos (figura 5). Para identificar estas interacciones, nosotros planeamos utilizar un acercamiento que es una adaptación del trabajo del Dr. Cheverud en cuanto a los efectos genéticos complejos. La aplicación de nuestro novedoso abordaje revelará genes importantes que modificarán la relación entre los desenlaces neurológicos tempranos y sus variantes genéticas en presencia de tPA. Aquellas interacciones pueden ser invisibles para los estudios tradicionales de asociación. La relación cambiante entre tPA, SNPs y los desenlaces tempranos arrojarán a la luz los mecanismos por los cuales las variantes genéticas y los genes influyen en los desenlaces. La figura 5 ilustra estos diferentes escenarios con respecto a la dependencia de tPA. Estos GWAS describen en el objetivo 3 combinarán pacientes tratados y no tratados con tPA para buscar asociaciones genéticas con desenlaces neurológicos tempranos después del EVCia. EN este objetivo, separaremos el análisis de los pacientes tratados con tPA y los no tratados, permitiéndonos mirar los efectos diferenciales. Para cada alelo candidateado, existen múltiples posibles interacciones con tPA. La figura 5A muestra un escenario en donde los efectos genéticos no están alterados por el tratamiento con tPA (efecto tPA independiente). Aquí, la dosis de alelos influye en el Δ NIHSS_{24h}, pero el estado de tratamiento de tPA no afecta esta relación de desenlace-alelo. En el caso de la figura 5B, el tratamiento con tPA altera la relación entre la dosis de alelo y los desenlaces de estos alelos candidatos y, por lo tanto, estas variantes deben considerarse dependientes de tPA. La figura 5C ilustra un caso en el cual es claramente efecto dependiente de tPA en cuanto a la relación alelo-desenlace, pero debido a la población combinada (tratados con tPA y no tratados), no se muestra la asociación con el desenlace, estas variantes no serán detectadas por medio del GWAS tratado en el objetivo 3. Los modelos mostrados en la figura 5 están basados en los datos biológicos actuales. Para acomodar estos modelos posibles, proponemos el siguiente plan de trabajo.

Plan de trabajo: analizaremos cerca de 300 muestras que serán las más significativas de las SNPs identificadas en el objetivo 1 (Serie Discovery) y genotipificadas en las series de Replicación (objetivo 3) son dependientes de

tPA. Compararemos el tamaño del efecto de las variantes de pacientes tratados con tPA y los no tratados y analizaremos si las interacciones entre SNP vs tPA son significativas en modelos lineales en términos de interacciones (epistático o interacciones GxE).

Análisis estadístico: cerca del 50% de los pacientes de las Series Discovery + Replicación serán tratados con tPA. Para identificar las variantes/genes asociados con respuestas clínicas tempranas en personas tratadas con tPA IV, estratificaremos las cohortes de Replicación + Discovery con base en el tratamiento de tPA IV, y compararemos el tamaño del efecto en cada sub análisis. Con el fin de identificar las variantes genéticas que influyen en la respuesta a tPA, realizaremos métodos estadísticos innovadores para analizar las interacciones entre GxE y Δ NIHSS_{24h} y el tratamiento con tPA. Las covariables importantes tales como el NIHSS basal, la edad y el tiempo que transcurrió entre el inicio del ictus y el tratamiento, serán determinadas utilizando análisis de regresión por pasos y se incluirán en el modelo del análisis. Siguiendo a Pavlicevic y cia., utilizaremos el siguiente modelo de regresión lineal estándar:

$$dNIHSS_{ijk} = u + \beta_{\text{covariables}} X_{\text{covariables}} \dots + \beta_a \text{SNP}_{aj} + \beta_{\text{tPA}} \text{tPA}_k + \beta_{a^* \text{tPA}} (\text{SNP}_{ai} * \text{tPA}_k) + e_{ijk}$$

en donde la significancia para la interacción GxE serán determinadas por el término (SNP_{aj}tPA_k). Antes de cada evaluación, los parámetros del modelo serán ajustados de la manera acordada. Estas evaluaciones serán sometidas a una $\alpha=0.05/300$, con base en el número de prueba que correremos. Una de las ventajas de este acercamiento sobre las otras interacciones GxG es que en el GxG los números posibles de las combinaciones potenciales incrementan exponencialmente con el número de SNPs estudiadas. Sin embargo, en este modelo, únicamente tendremos cuantas pruebas potenciales como números de SNPs analizados.

Poder. EL poder de cálculo de este estudio es complicado debido a la arquitectura genética subyacente es compleja y desconocida. El poder para detectar el tamaño específico del efecto disminuirá conforme disminuyan los MAF. Como resultado, tendremos mayor poder para variantes más frecuentes. Nosotros utilizamos el programa Quanto para calcular la fuerza de la muestra

(tabla 13) para la hipótesis primaria y las interacciones aditivas por rasgos (tPA vs SNP) en varias frecuencias alélicas, con un umbral conservador de Bonferroni para 300 muestras ($\alpha = 1.6 \times 10^{-4}$).

Tabla 13. Poder de cálculo para el continuo (Δ NIHSS _{24h}) Por medio del rasgo de interacción binaria (tratamiento con tPA) Para varios Delta n=4000, $\alpha = 1.6 \times 10^{-4}$	
MAF	Delta para la obtención de 80% de fuerza
30%	0.40
15%	0.55
5%	0.80
2.5%	1.3
1%	1.5
0.5%	2.0
0.25%	>3

Trampas y abordajes alternativos: 1) debido a que los dos grupos (tratados con tPA y no tratados) tendrán diferentes características basales (el tratamiento no está aleatorizado), habrá diferencias ambientales y genéticas que confundirán el análisis de interacción. Para conducir estos confusores potenciales, utilizaremos análisis de regresión logística para ajustar las diferencias basales; asegurándonos que las asociaciones genéticas serán independientes de la influencia de estas otras variables. 2) para mejor entendimiento de la arquitectura genética luego de la recanalización posterior al ictus isquémico, confirmaremos las influencias genéticas dependientes de tPA en la subpoblación de pacientes tratados con tPA que tienen monitoreo con DTC. Determinaremos si los genes candidatos dependientes de tPA predicen el estado de recanalización luego del tratamiento fibrinolítico y mediante la evaluación con DTC (realizado de forma rutinaria en VHUH en todos los pacientes que se tratan con tPA; 700 pacientes tendrán datos de DTC al final del estudio). Esto permitirá encontrar genes y vías genéticas que pudieran estar involucradas en la recanalización. 3) Nosotros podemos correr un análisis de interacción con el genoma ampliado en la Serie *Discovery* (n=1000) para identificar SNPs novedosos que en general no muestran fuerte asociación con la recuperación temprana, pero muestra grandes interacciones con tPA (figura 5C). De cualquier modo, el poder será bajo.

Próximos estudios: 1. La asistencia económica adicional nos permitirá realizar genotipificación del genoma ampliado para todas las muestras de Replicación, para permitir el análisis de interacción del genoma ampliado. 2. Los genes y variantes candidatos encontrados en este objetivo (de las cohortes *Discovery* + Replicación) la necesidad de ser replicados en otras poblaciones más extensas. Nosotros colaboraremos con IGSC para hacer esto. 3. La transformación hemorrágica probablemente sea tPA dependiente. Por lo tanto, la influencia genética dependiente de tPA en el DNIHSS_{24h} puede ser dependiente de transformación hemorrágica o independiente. La investigación de la interacción genética entre tPA, TH y DNIHSS_{24h}, va más allá del alcance de esta subvención, pero la serie combinada de *Discovery* y Replicación proporcionará los datos necesarios para dicho análisis.

Protección de los seres humanos

Riesgo de los seres humanos

Implicación de los seres humanos, características y diseño.

Los objetivos del estudio es encontrar variantes genéticas que estén asociadas con desenlaces neurológicos tempranos posterior a un ictus isquémico agudo. Nosotros planeamos participar como uno de los subgrupos – perteneciendo a la población de México – que reclute cerca de 3,000 pacientes que hayan sufrido ictus isquémico.

Todos los pacientes con EVCia serán tamizados para el estudio y enlistados con base en los criterios de inclusión y exclusión (se muestran a continuación en la siguiente tabla), sin restricción en relación con el género, raza, edad o estado socioeconómico. Los criterios de reclutamiento están diseñados para incluir pacientes con ictus isquémico que lleguen al hospital dentro de las primeras 6 horas de iniciado el evento para que así, se pueda capturar una evaluación neurológica precoz. Se trata de un estudio observacional que incluye SOC (*standard-of-care*) sin ningún tipo de intervención experimental.

Criterios de selección
Criterios de inclusión:

- | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">6. Ictus isquémico7. Edad ≥ 18 años8. Llegada al hospital dentro de las 6 primeras horas del inicio de los síntomas del ictus9. Déficit neurológico medible10. Tratados con tPA IV de 0-4.5 horas (ventana) o no tratados con tPA IV |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Criterios de exclusión:

- | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">4. Incapacidad para conseguir el consentimiento informado5. Incapacidad para conseguir muestra de sangre6. Tratamiento con tPA intrarterial o trombectomía |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Recursos materiales.

La demografía, examen físico e historia clínica basal será tomada por el coordinador de cada proyecto. Estos datos incluyen edad, género, raza, fecha/hora del inicio del ictus, eventos cerebrovasculares previos (AIT, EVC o hemorragia intracraneal), historia vascular previa (HAS, DM2, hiperlipidemia, FA, Tabaco, IAM, insuficiencia cardiaca congestiva [ICC], endarterectomía carotídea previa o colocación de *stent*, procedimientos vasculares periféricos), tratamiento en pacientes hospitalizados, resultado de los estudios de imagen y medicamentos concomitantes. Finalmente, se medirán NIHSS seriados en el momento de llegada al hospital, a las 24 horas y si continúa hospitalizado, a las 48 y 72 horas, además de cuando egrese. EN la visita que debe realizar el paciente a los tres meses, se deberá completar información adicional, ya sea del propio paciente o de su cuidador, incluyendo la rehabilitación hospitalizado y como paciente externo, hospitalizaciones en este intervalo de tiempo e historia de ictus recurrente o muerte. Además, se deberá realizar un nuevo NIHSS y mRS en la consulta de los 3 meses.

Durante la hospitalización y después de firmado el consentimiento informado, se extraerán 20 mL de sangre por parte del coordinador y los ayudantes del proyecto y el tubo o tubos, serán marcados con el nombre del paciente, fecha de nacimiento, fecha y hora en que se tomó la muestra y la clave de envío con el Dr. Cruchaga o la Dra. Heitsch. Una vez recibido por el núcleo de la subvención, todos los especímenes se adherirán en los conjuntos de datos de los bioespecímenes (vinculados con un conjunto de datos clínicos) y asignados con un identificador único. Los tubos cubiertos de una camisa blanquecina serán almacenados; se extraerá y aislará el ADN de cada de los ejemplares utilizando el formato de columna giratoria Qiagen y será evaluada la pureza ácido nucleica

obtenida de la relación entre A_{260}/A_{280} de la espectroscopía de fibra óptica ultravioleta. El ADN se cuantificará por medio de la absorción A_{260} leyéndose y ajustándose a una concentración final uniforme de 50 ng/ul en 10 mM Tris / 0.1 mM EDTA. Las muestras de ADN serán alicatadas en cantidades de 5 ug (100 μ l) y almacenadas a -70°C en un sistema de inventario.

Solo los investigadores del estudio y el personal directamente involucrado en los datos y las muestras tendrán acceso a la información privada individual acerca de los pacientes.

Riesgos potenciales.

No hay riesgo relacionado con el tratamiento en este estudio. No está siendo probado ningún tipo de tratamiento – médico o quirúrgico – experimental ni para investigación. El riesgo principal para este estudio es la privacidad para el paciente. El acceso a la información será restringido para aquellos con interés legítima en la investigación. La anonimidad de los pacientes se mantendrá en todas las publicaciones.

Conciliación de la protección en contra de los riesgos

Reclutamiento y consentimiento informado.

Los investigadores o sus representantes abordarán pacientes (o a los familiares de los pacientes, si el paciente es considerado incapaz de dar su consentimiento informado en virtud del daño neurológico causado por el suceso cerebrovascular) que cumplan con los criterios de selección múltiples veces mencionado; El médico a cargo del enfermo o el familiar del mismo, será informado que no existe ningún beneficio inmediato que pueda obtener su pariente en este momento. El consentimiento informado se expide y se firma con base en el acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y a la NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 con fecha de publicación el día 5 de noviembre de 2009 en el Diario Oficial de la Federación y aprobada por el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Innovación, Desarrollo, Tecnologías e Información en Salud. Todo esto previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal de Metrología y Normalización. Esta ley y la aprobada en el proyecto de acuerdo con los

estatutos de San Louis, MO XXVI, Sección 431.064 en cumplimiento con la Declaración de Helsinki. El Consentimiento Informado que firmarán todos los pacientes que sean reclutados en este proyecto están aprobados y previamente revisados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Se les comentará a los pacientes o a los familiares responsables de los mismos, la finalidad de esta investigación en cuanto al estudio en extenso de los genes que pueden estar involucrados en los desenlaces neurológicos tempranos cuando sufren ictus isquémico y en la secuencia que se utilizará para tratar de identificar dichos genes, los cuales – a la larga – podrán modificar ciertos tratamientos (tales como tPA), nos permitirán encontrar nuevos blancos terapéuticos que algún día podrán ser capaces de tergiversar el pronóstico funcional de las personas después de un ictus. Los candidatos estarán informados que el estudio incluye la colección de menos de dos cucharadas de sangre para el análisis genético y de su colección dentro del conjunto de datos clínicos que obtendremos durante su estancia hospitalaria. Además, estos pacientes serán evaluados luego de 3 meses de haber sucedido el evento por los coordinadores del proyecto.

Protección contra los riesgos.

El acceso al global de los datos estará restringido para aquellos con interés legítimo en la investigación. La anonimidad de los pacientes se mantendrá en todas y cada una de las publicaciones que deriven de este trabajo. Todos los datos escritos estarán cerrados en gabinetes detrás de puertas con candado, Además, los datos de la computadora estarán guardados en servidores seguros y aquellos servidores que tengan fácil acceso requerirán una clave única de protección.

Beneficios potenciales de la investigación propuesta.

A pesar de que no existe un beneficio potencial para los pacientes que aquí son reclutados, podrá haber beneficios para la sociedad en un periodo de tiempo mediato. La identificación de nuevos genes involucrados en la recuperación

temprana después del ictus isquémico podrá favorecer tratamientos futuros que incluyan estos blancos genéticos y ayuden a la recuperación o la potencien.

II. Epidemiología del ictus isquémico en población mexicana adulta

Introducción

Este trabajo nos ha dado la oportunidad de captar una muestra considerable de pacientes que padecen un ictus isquémico y que llegan dentro de las primeras horas al hospital.

Actualmente, el ictus isquémico corresponde a la segunda causa de muerte en el mundo y la primera causa de discapacidad en población económicamente activa; tiene una prevalencia global de 2.6% en aquellas personas mayores de 20 años con base en las estadísticas entre los años 2009 y 2012¹. Aproximadamente el 85% de la Enfermedad vascular cerebral es de tipo isquémico. Además, 17.8% de las personas por arriba de los 45 años han experimentado síntomas de ictus y, los infartos cerebrales silentes se observan entre el 6% y el 28% de la población; el porcentaje se incrementa conforme a la edad. El riesgo de recurrencia de ictus isquémico es aproximadamente del 20% a 5 años.

En los últimos 30 años o más, tanto la incidencia como la mortalidad del EVCi ha disminuido. En estadísticas muy generales, hemos observado que el riesgo de ictus en personas que están por arriba de los 65 años ha bajado 40% de 1988 a 2008; y el ajuste de la edad con respecto al riesgo de muerte por esta etiología ha disminuido la tasa hasta en un 33.7% de 2003 a 2013¹. A su vez, también el riesgo de recurrencia ha mostrado decremento. En pacientes que se han agrupado estadísticamente de los ensayos que se han realizado con respecto a la prevención del ictus, hemos observado una caída con respecto a la tasa anual de recurrencia del EVCi de 8.71% en los años 60`s hasta 4.98% a principios del año 2000². La recurrencia del ictus también tiene que ver con una mayor carga de factores de riesgo, y que también han

mejorado en la prevención a lo largo de estas décadas. Esto incluye las altas dosis de estatinas (4% a 41%) y los antihipertensivos (53% a 73.5%) entre los años de 1992 y 2008.³

Mientras que el EVCi es más común en hombres que en mujeres cuando son menores de 45 años, las mujeres tienen riesgo más alto de ictus isquémico que los hombres cuando tienen más de 50 años (20% a 21% versus 14% a 17%) con peores desenlaces funcionales.^{4, 5}

La raza negra y los Mexicoamericanos tienen mayor incidencia de EVCi en los grupos de personas jóvenes en cuanto a mortalidad del ictus que los blancos no-hispánicos.²

Factores de riesgo asociados con enfermedad vascular cerebral de tipo isquémico. La prevención del ictus requiere manejo de los principales factores de riesgo, incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus y consumo de tabaco, así como el uso de terapia antitrombótica. Una cantidad sustancial de los ictus podrían prevenirse con estas medidas.

- *Hipertensión:* Es el factor de riesgo modificable de ictus más común, afectando alrededor de un tercio de las personas por arriba de 20 años en el mundo. En países de primer mundo, solamente la mitad de los pacientes que padecen hipertensión arterial sistémica se tratan. Calculamos que, en países en vías de desarrollo, como México, solamente una quinta parte de la población con esta enfermedad es la que se trata de forma óptima.
- *Hiperlipidemia:* La evaluación y tratamiento para la hiperlipidemia es tan crítica para el manejo del ictus que es una de las medidas de calidad de la Comisión Conjunta de Hospitales (*Joint Commission*). EN 2013, el Colegio Americano de Cardiología y la AHA cambiaron los parámetros y los estándares de tratamiento para los pacientes con daño cerebro y cardiovascular y proporcionaron nuevas metas de control lipídico. Estas se enfocaron principalmente en los niveles de colesterol de baja densidad (LDL-C) tendiendo como enfoque y como objetivo el tratamiento con estatinas que son las que pueden disminuir el colesterol hasta en 50% o más (estatinas de alta potencia) o entre 30% y 50% (estatinas de mediana potencia). Establecieron que los pacientes que se podrían ver

beneficiados con el uso de estatinas de potencia moderada o alta eran los grupos siguientes: A) pacientes con enfermedad cardiovascular de clínica aterosclerótica, B) Aquellos con LDL-C igual o mayor a 190 mg/dL, C) Pacientes que se encuentran entre los 40 y los 75 años de edad y que tienen comorbilidad con diabetes mellitus tipo 2 y LDL-C entre 70 mg/dL y 189 mg/dL, D) Aquellas personas sin enfermedad cardiovascular ni aterosclerótica o diabetes mellitus que tienen entre 40 y 75 años de edad con LDL-C entre 70 mg/dL y 189 mg/dL y un riesgo cardiovascular a 10 años igual o mayor a 7.5%; todos estos barruntos dentro del tópico de prevención primaria. En cuanto a la prevención secundaria se recomienda tratamiento con estatinas de alta potencia (Atorvastatina y Rosuvastatina) para pacientes con EVCi o ataque isquémico transitorio (AIT) que se presume sean de causa aterosclerótica y el inicio de la terapia cuando el LDL-C está por arriba de 100 mg/dL o mayor, este último apartado aún sin evidencia de que el EVCi o el AIT haya sido de causa aterosclerótica.

- *Diabetes mellitus y síndrome metabólico:* Todos los trastornos en el metabolismo de la glucosa son factores de riesgo altos para el ictus isquémico, incluyendo diabetes mellitus tipo 1 y 2 y prediabetes (definido por la HbA_{1c} = 5.7% a 6.4%). Estos trastornos son harto prevalentes en los pacientes con EVCi: 28% tienen prediabetes, 25% a 45% tienen diabetes mellitus. Además, la diabetes mellitus es un factor de riesgo independiente y corresponde al 60% para pacientes con ictus recurrente y ancianos. De tal manera, las guías de prevención secundaria de la AHA/ASA recomiendan que los pacientes con EVCi de nuevo inicio o AIT deben ser tamizados para diabetes mellitus con HbA_{1c}, o prueba de tolerancia a la glucosa vía oral. La Asociación de Diabetes recomienda que, para la mayoría de los pacientes que se conocen con diabetes mellitus, la meta de hemoglobina glucosilada debe ser menor a 7%.

En cuanto al síndrome metabólico, el diagnóstico se hace con base en las siguientes características cuando están presentes tres o más de ellas: (1) Glucosa en ayuno de 100 mg/dL o más o el paciente está en tratamiento para el control glucémico; (2) colesterol de alta densidad (HDL-C) de 40 mg/dL o menos para hombres y 50 mg/dL o menos para mujeres o que el paciente se encuentre en tratamiento con estatinas para el control lipídico; (3) Triglicéridos de 150

mg/dL o mayor, o que la persona esté en tratamiento para control de esta entidad. (4) Circunferencia cintura cadera en hombres >102 cm o más y en mujeres > 88 cm o más. (5) Presión arterial de 130 mm Hg o más de sistólica o 85 mm Hg o más de diastólica o que la persona se encuentre en tratamiento para la presión arterial.

Los datos más recientes suponen que el síndrome metabólico afecta un total de 35% de la población mundial. Este síndrome, antes llamado síndrome X, incrementa el riesgo de padecer EVCi entre 1.5 y 23 veces más en mujeres y hasta 6 veces más en hombres según estudios terminados en 2013.

- *Consumo de tabaco:* Las personas que son fumadores activos tienen al menos el doble de riesgo de padecer EVCi, con una aparente relación entre dosis-respuesta. El riesgo regresa a su estado basal luego de 10 años de abstinencia. EL riesgo para la población de “fumadores pasivos” es alrededor del 30%.

Uno de los principales problemas de nuestro país es la obesidad; según datos recientes del INEGI, ocupamos primer puesto mundial en obesidad infantil y el segundo lugar en obesidad en personas adultas. En cuanto a la relación que guarda la obesidad con el ictus isquémico sabemos que es un factor de riesgo bien establecido; los estudios epidemiológicos han mostrado que, empezando con un índice de masa corporal (IMC) de 20 kg/m², por cada unidad que incrementa el IMC (alrededor de 7 libras que en nuestro sistema métrico corresponde a 3.17 kilogramos), el riesgo de EVCi incrementa cerca de 5%.

- *Tratamiento antiplaquetario:* en personas que no tienen una fuente cardioembólica, el tratamiento antiplaquetario es el pilar de prevención para el ictus isquémico, reduciendo consistentemente el riesgo de EVCi recurrente a lo largo de los estudios realizados. La opción a la que la gran mayoría de las personas tienen acceso por ser barata y fácil de conseguir es la Aspirina, la cual tiene un rango de dosis entre prevención cardiovascular y segura para evitar hemorragias entre 81 mg y 325 mg al día. En cuanto a prevención secundaria, la aspirina reduce el riesgo de EVCi aproximadamente 15%, aunque sabemos bien que en los estudios extensos se ha determinado que se necesitan casi 77 pacientes que tomen aspirina para que se prevenga el riesgo de uno solo.

Hipótesis y justificación

Corresponden a las mismas que ya se mencionaron en la primera parte del trabajo.

Plan de trabajo

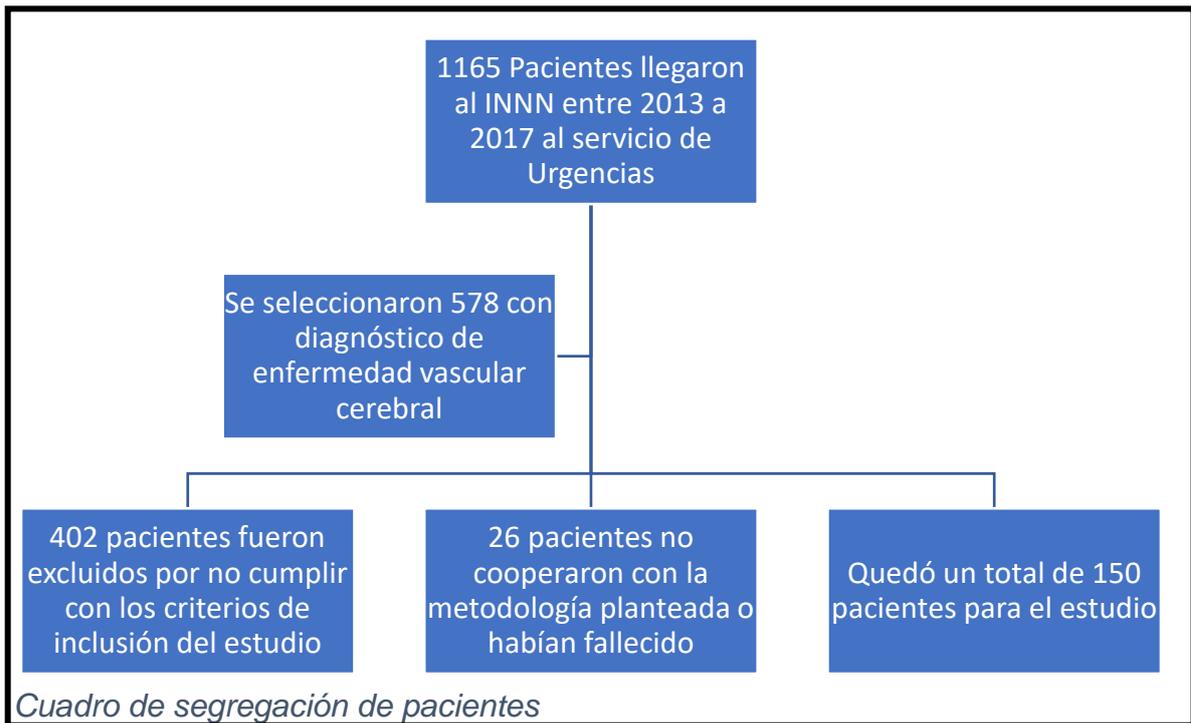
Corresponde al mismo ya mencionado en la primera parte del trabajo.

Material y métodos

Corresponde al mismo ya mencionado en la primera parte del trabajo.

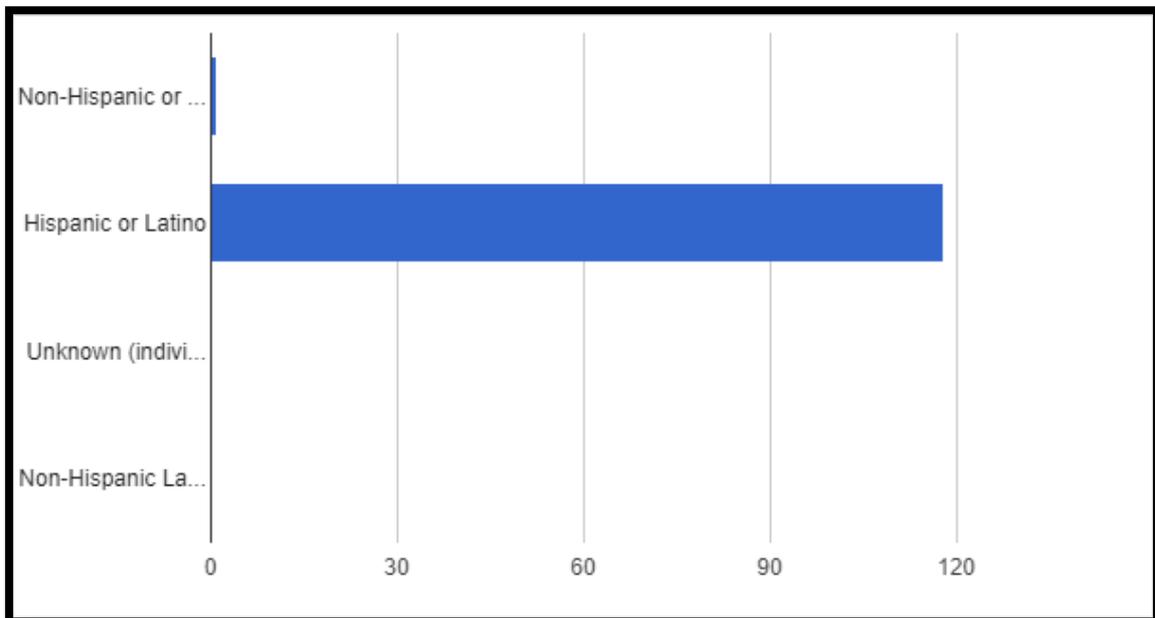
Resultados

Se evaluaron 1165 pacientes que llegaron al servicio de urgencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN) entre los años 2013 a 2017. De estos pacientes se seleccionaron 578 debido a que los otros enfermos no cumplían con criterios de exclusión o tuvieron otro diagnóstico. De estos 578 pacientes se seleccionaron solo 150 debido a que fueron los que llegaron dentro de las primeras 24 horas de iniciado el ictus y debido a que, de los 578 enfermos antes mencionados 26 de ellos no contestaron el teléfono o se nos comunicó que habían fallecido o que no tenían interés en participar en la parte retrospectiva de este estudio.

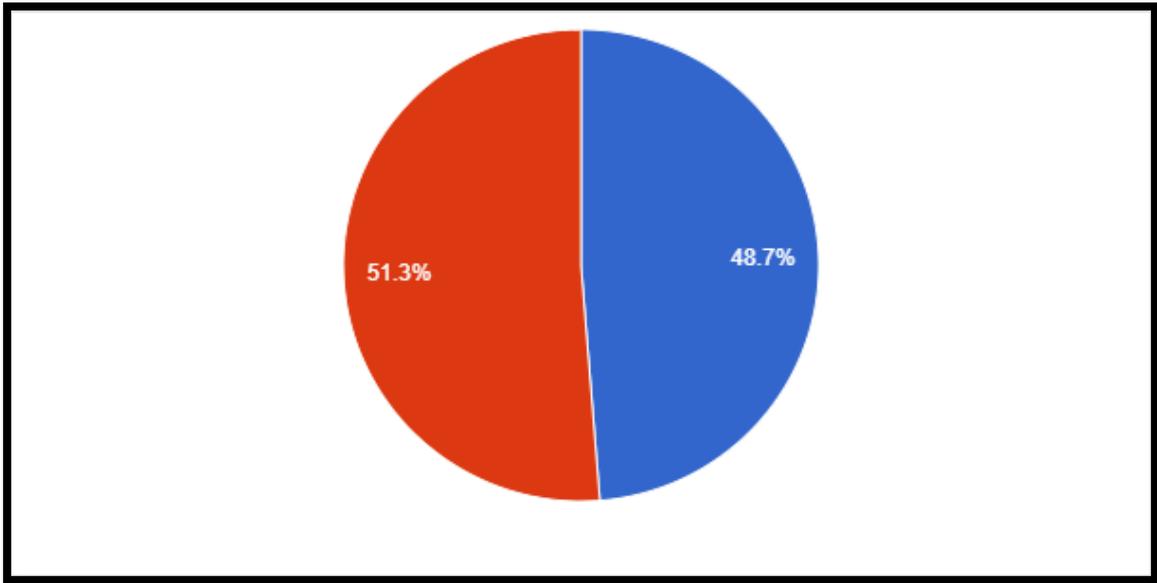


A continuación, mostramos las características demográficas de nuestro estudio:

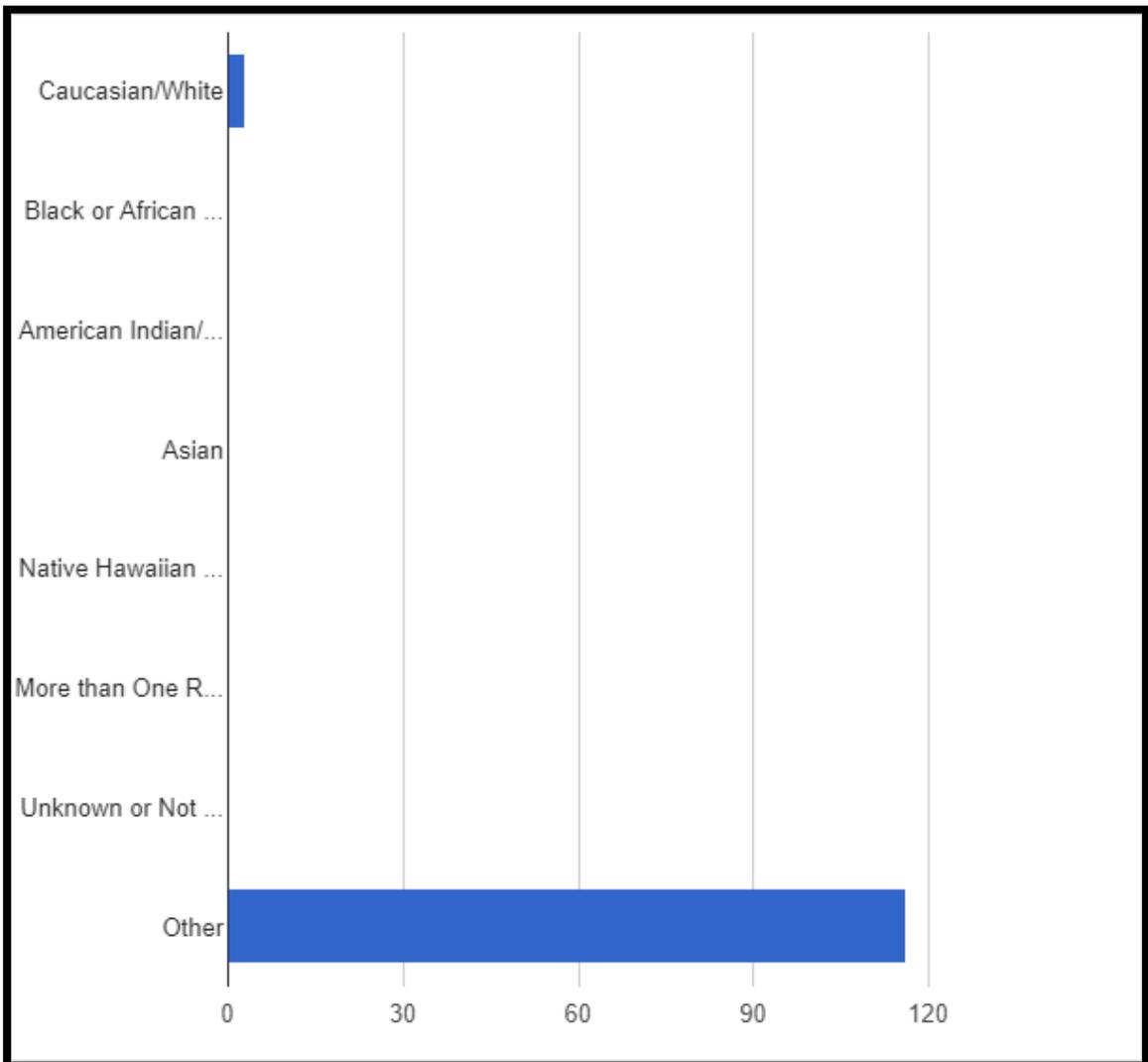
A) Etnia



B) **Género:** 51.3% hombres y 48.7% mujeres.

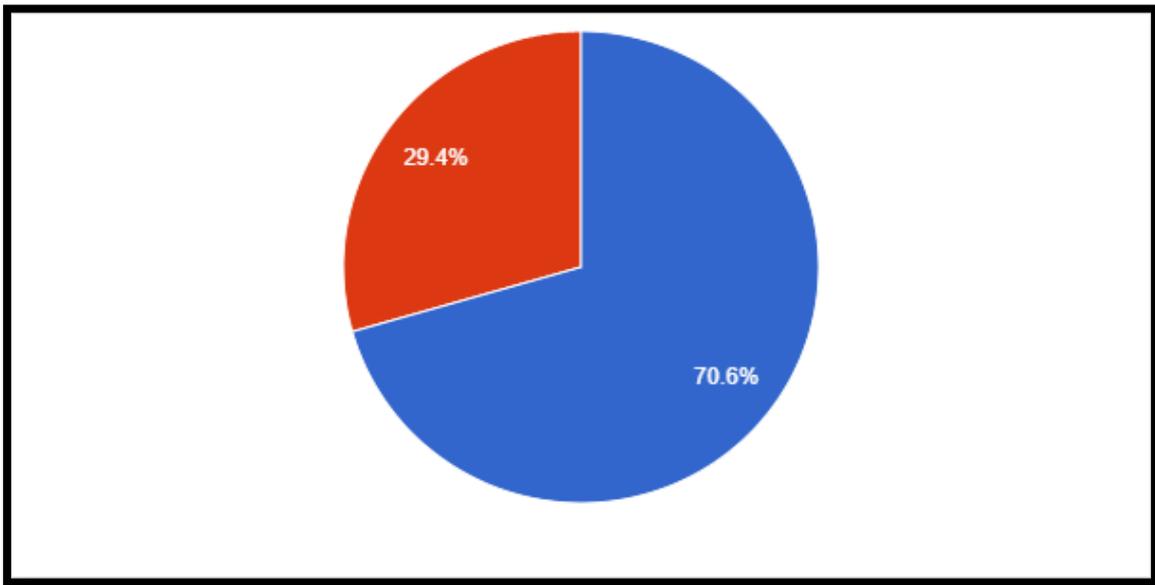


C) Raza

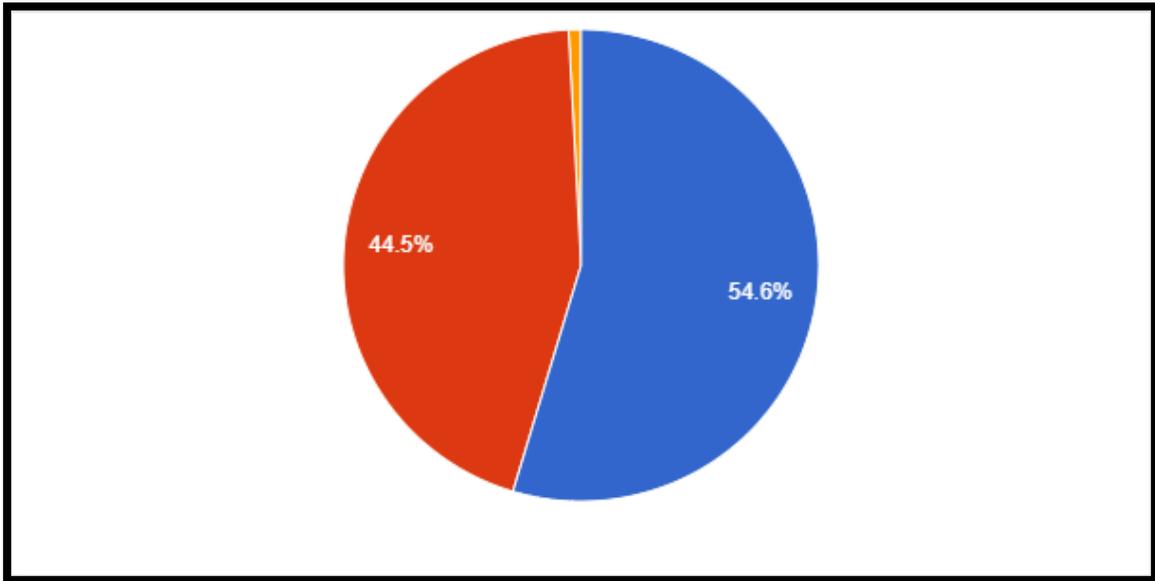


En las siguientes gráficas mostramos las características de cada uno de los pacientes en cuanto a la historia clínica que se realizó.

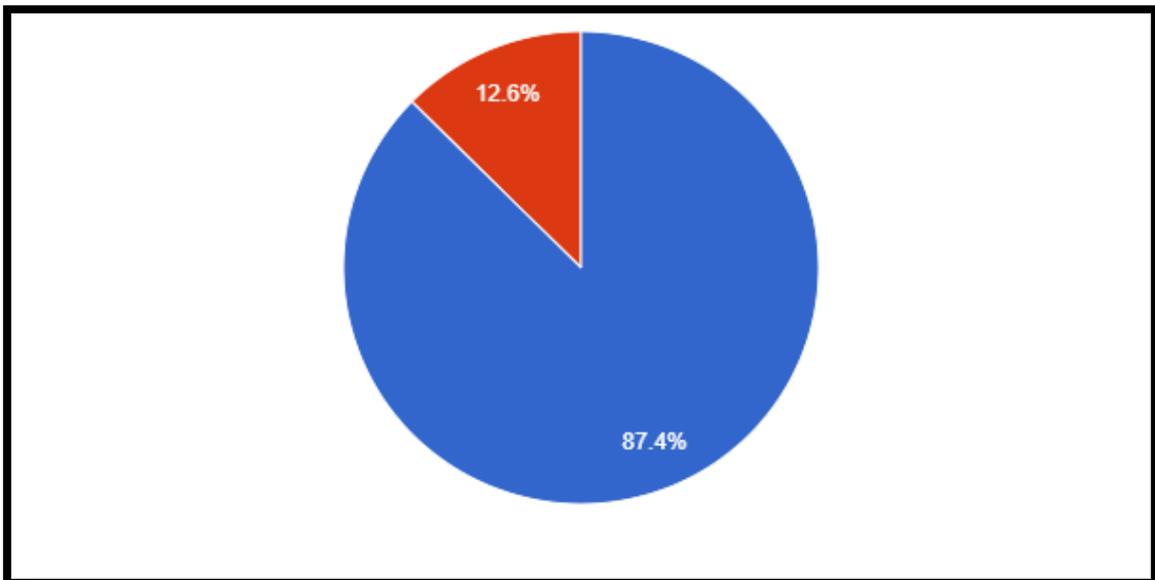
A) **Consumo de tabaco:** 29.4% consumían tabaco o habían abandonado en menos de un año; el 70.6% de los pacientes no consumían tabaco en el momento del ictus o hacia por lo menos 5 años que habían dejado el consumo.



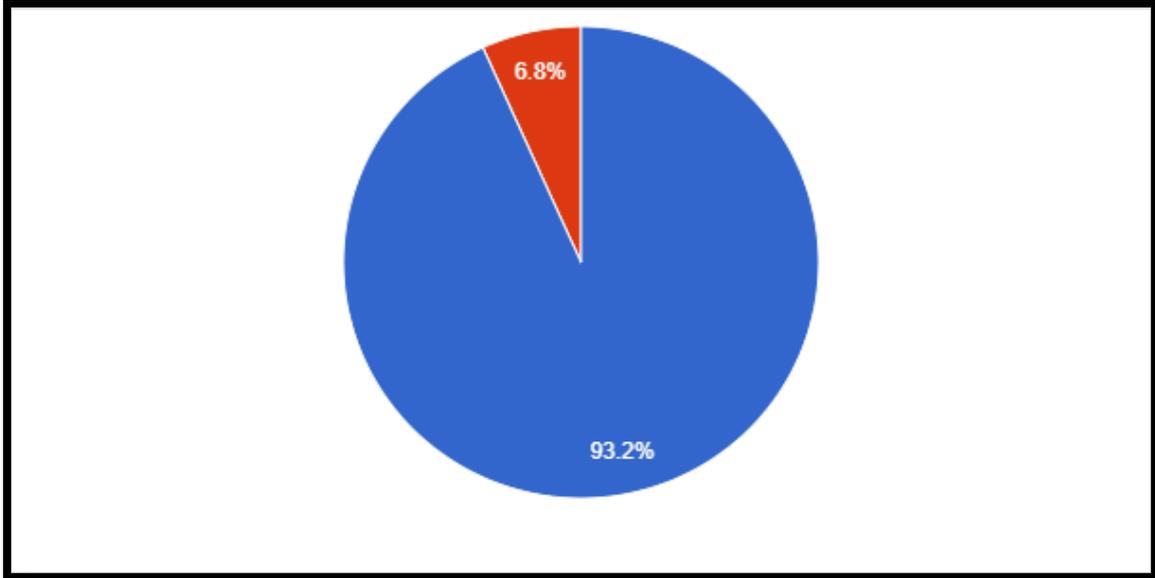
B) **Pacientes con hipertensión arterial sistémica:** 54.6% no tuvieron la enfermedad; 44.5% tenían HAS y solo 0.8% desconocía.



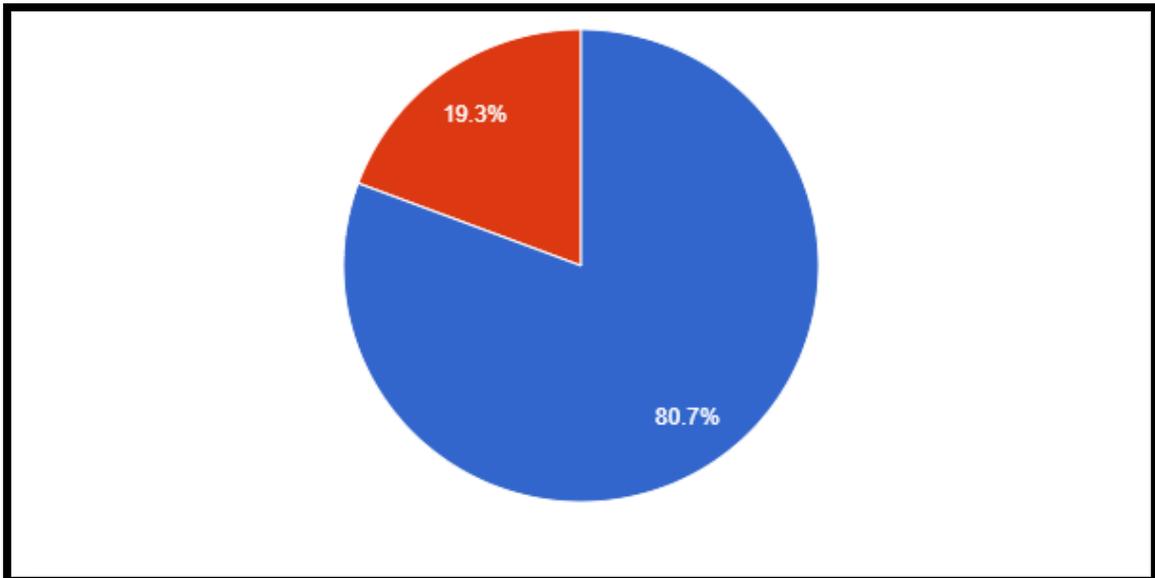
C) **Pacientes con historia de enfermedades cardiovasculares:** 0 - No (104, 87.4%), 1 - Si (15, 12.6%), 9 – Desconocido (0, 0.0%)



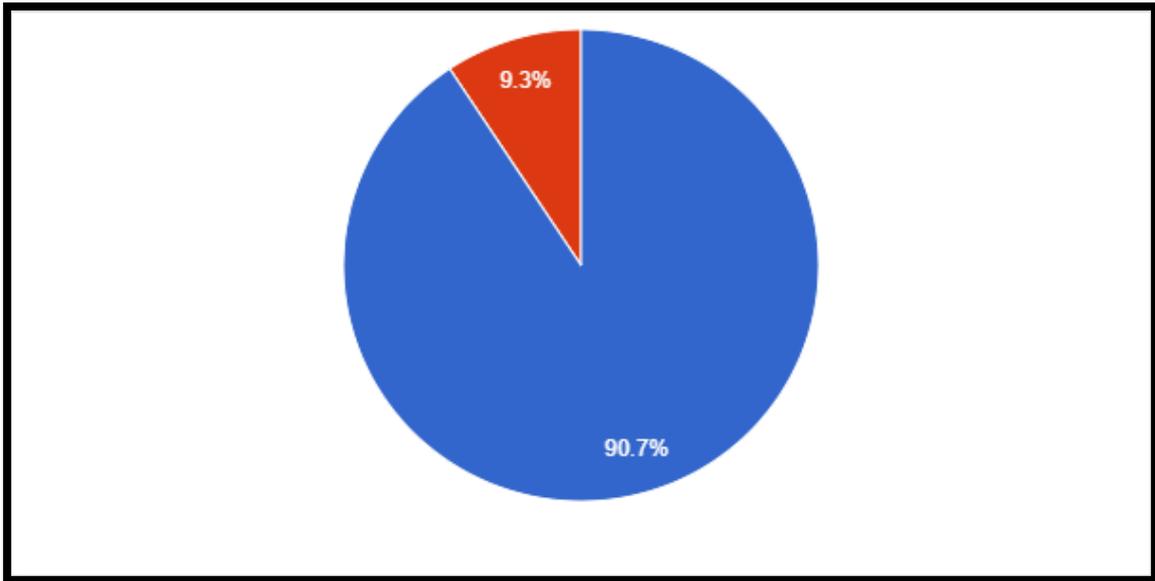
D) **Pacientes con historia de insuficiencia cardiaca:** 0 - No (110, 93.2%), 1 - Si (8, 6.8%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



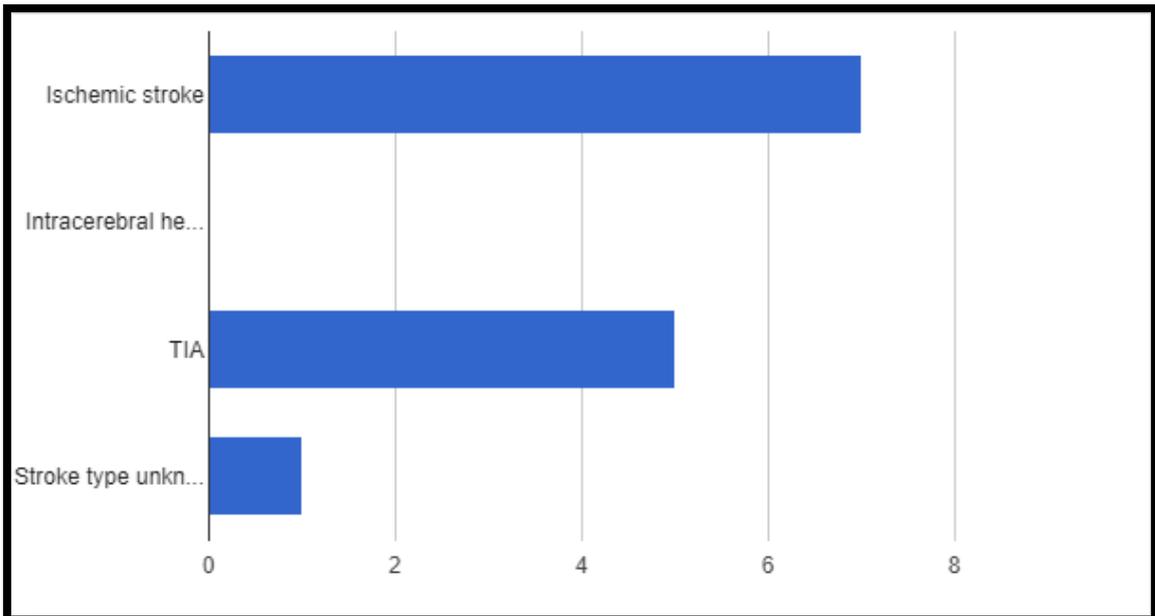
E) **Pacientes con historia de diabetes mellitus:** 0 - No (96, 80.7%), 1 – Si (23, 19.3%), 9 – Desconocido (0, 0.0%)



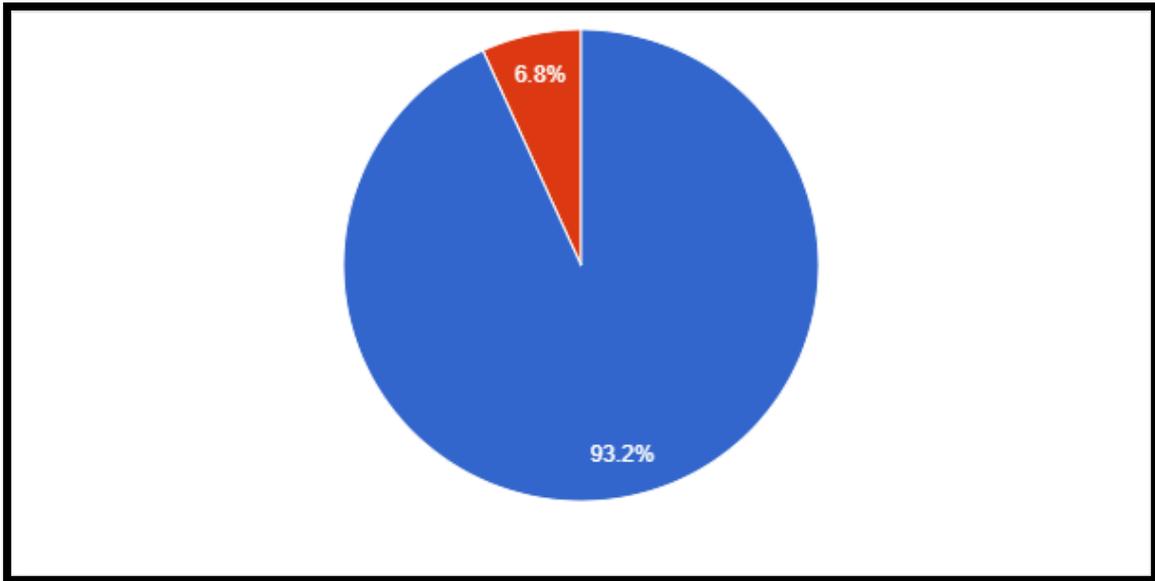
F) **Pacientes con historia de EVC isquémico o ataque isquémico transitorio:** 0 - No (107, 90.7%), 1 - Si (11, 9.3%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



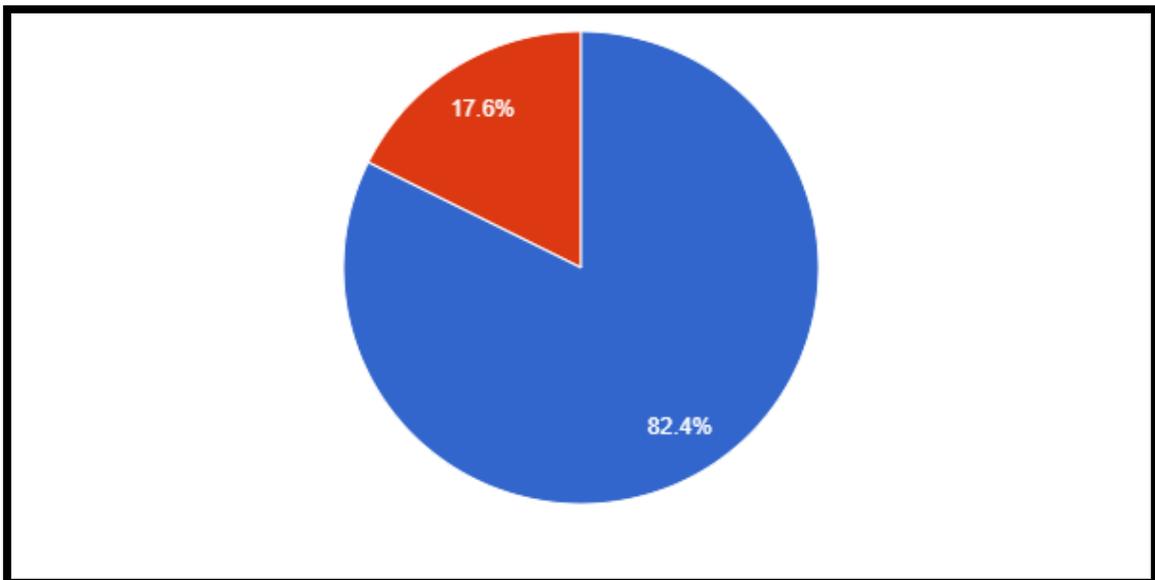
i) **Tipo de EVC que el paciente presentó:** EVC isquémico (7, 63.6%), Hemorragia intracerebral (0, 0.0%), AIT (5, 45.5%), EVC de tipo desconocido (1, 9.1%)



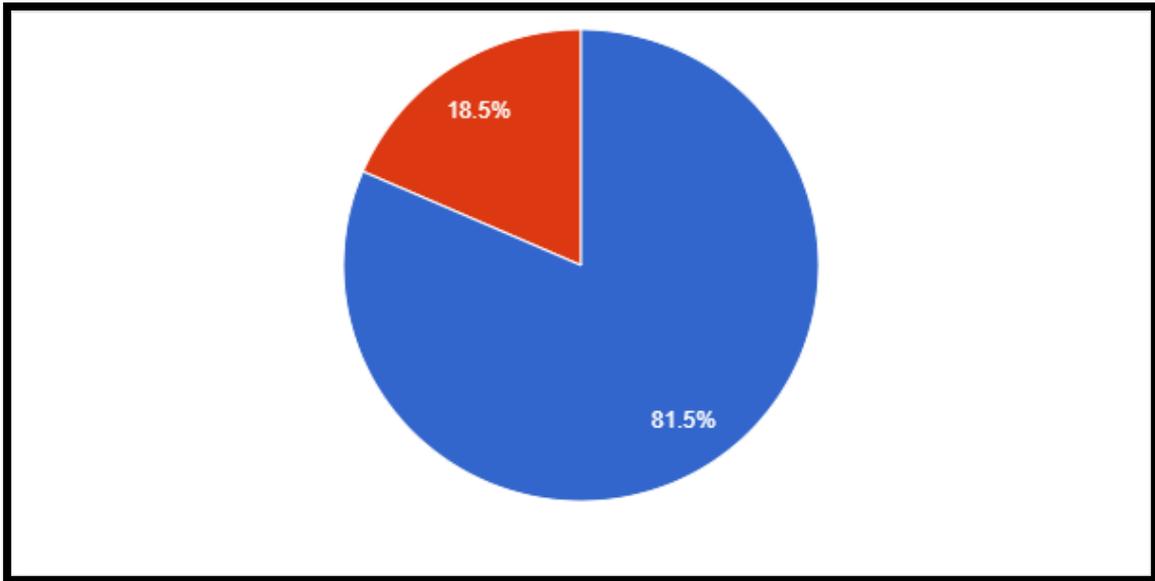
G) **Historia de fibrilación auricular (incluyendo FA paroxística):** 0 - No (110, 93.2%), 1 - Si (8, 6.8%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



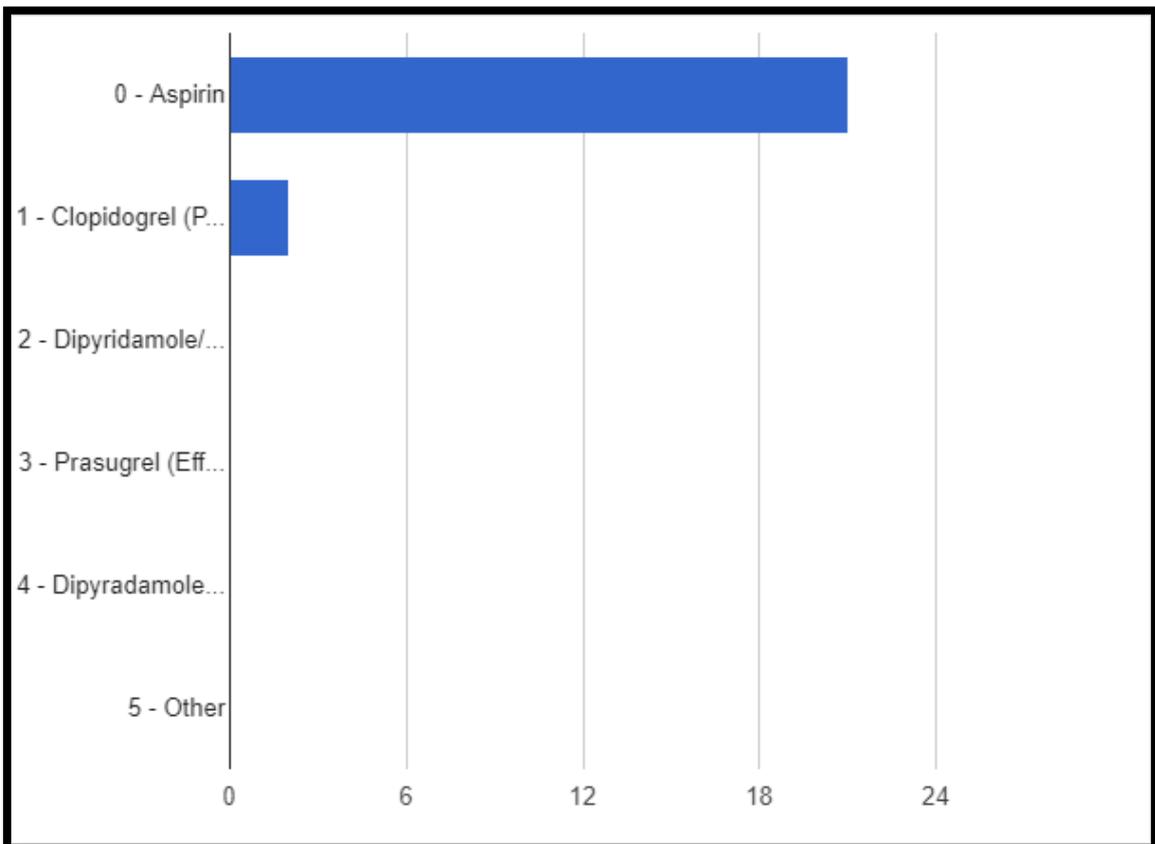
H) **Pacientes con antecedentes de dislipidemia:** 0 - No (98, 82.4%), 1 - Si (21, 17.6%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



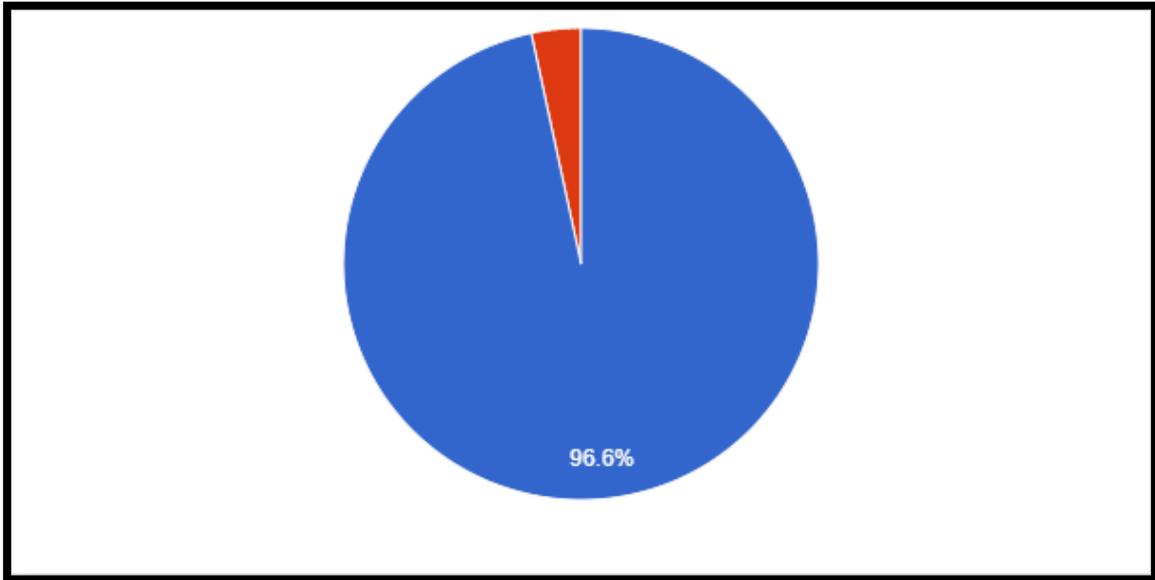
I) **Pacientes que actualmente tomaban antiplaquetario(s):** 0 - No (97, 81.5%), 1 - Si (22, 18.5%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



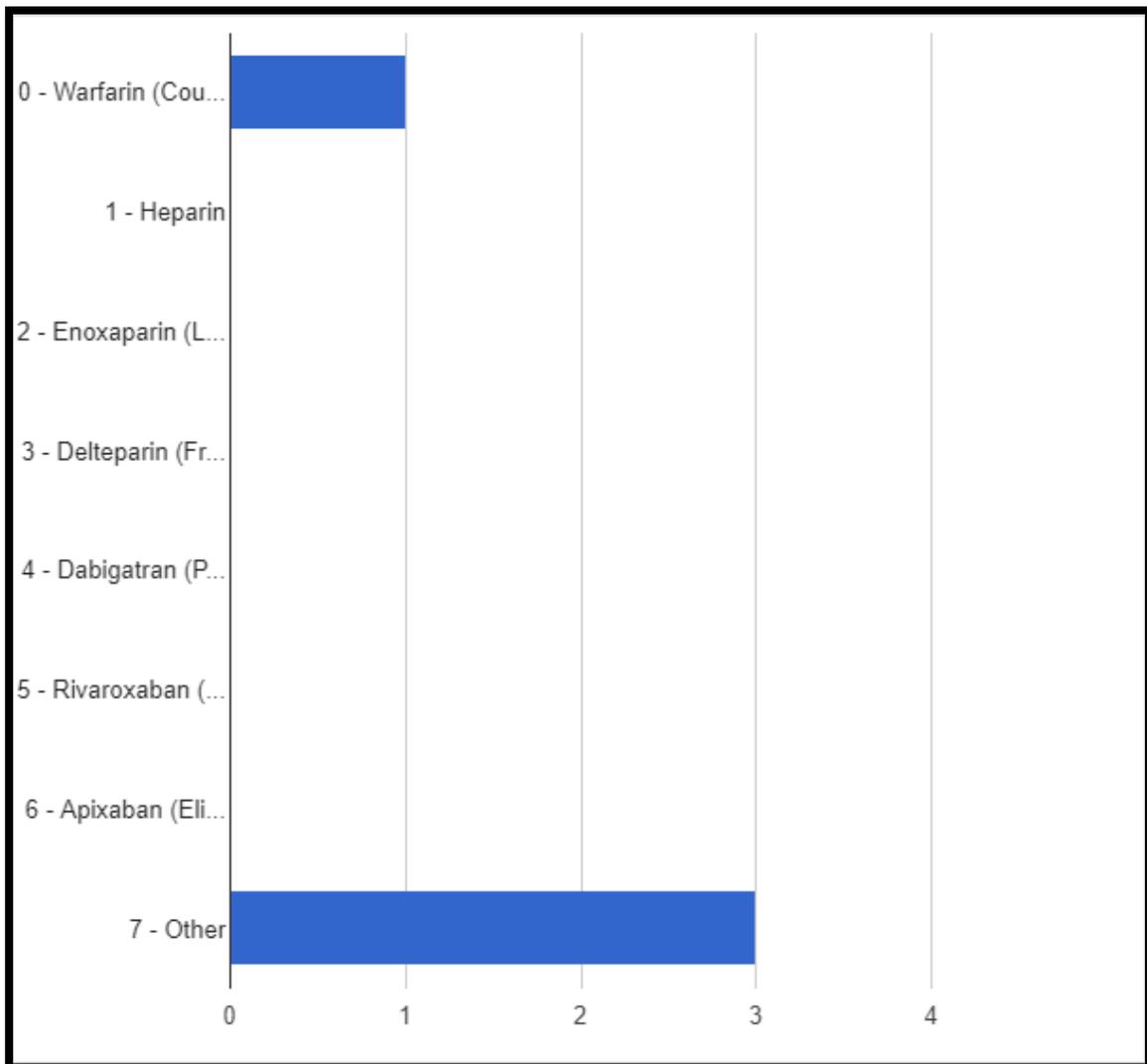
- i) **Tipo de Antiplaquetarios que los pacientes tomaban en ese momento:** 0 - Aspirina (21, 95.5%), 1 - Clopidogrel (Plavix) (2, 9.1%), 2 - Dipyridamole/aspirina (Aggrenox) (0, 0.0%), 3 - Prasugrel (Efficient) (0, 0.0%), 4 - Dipyradamol (Persantine) (0, 0.0%), 5 - otros (0, 0.0%)



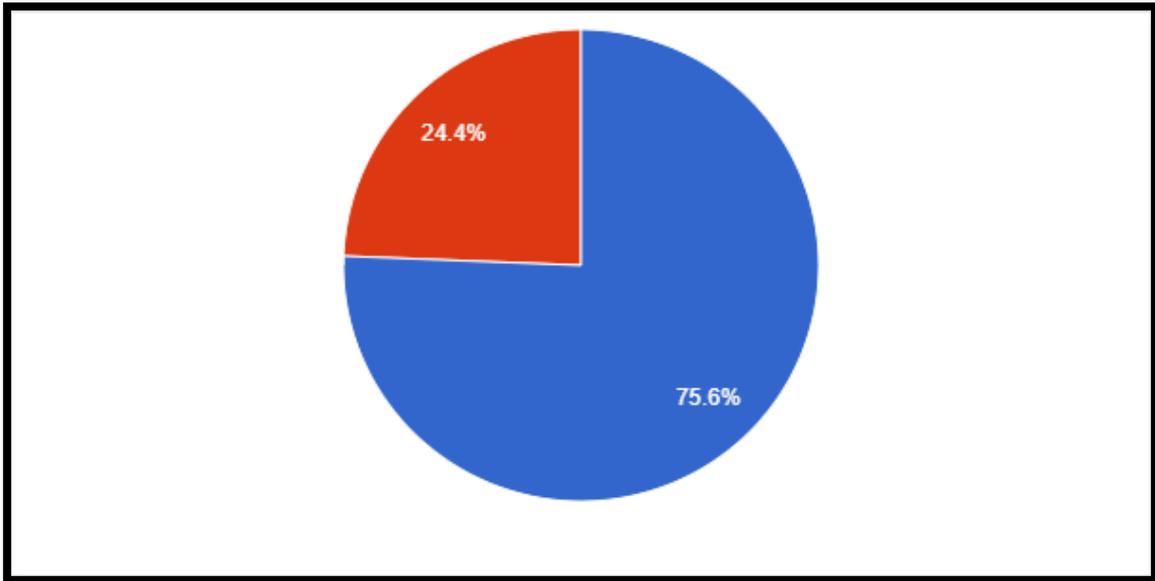
J) **Pacientes que estaban tomando algún tipo de anticoagulante:** 0 - No (115, 96.6%), 1 - Si (4, 3.4%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



i) **Tipo de anticoagulante que los pacientes estaban tomando:** 0 - Warfarina (Coumadin) (1, 25.0%), 1 - Heparina (0, 0.0%), 2 - Enoxaparina (Clexane) (0, 0.0%), 3 - Delteparina (Fragmin) (0, 0.0%), 4 - Dabigatrán (Pradaxa) (0, 0.0%), 5 - Rivaroxabán (Xarelto) (0, 0.0%), 6 - Apixabán (Eliquis) (0, 0.0%), 7 - Otros (3, 75.0%)



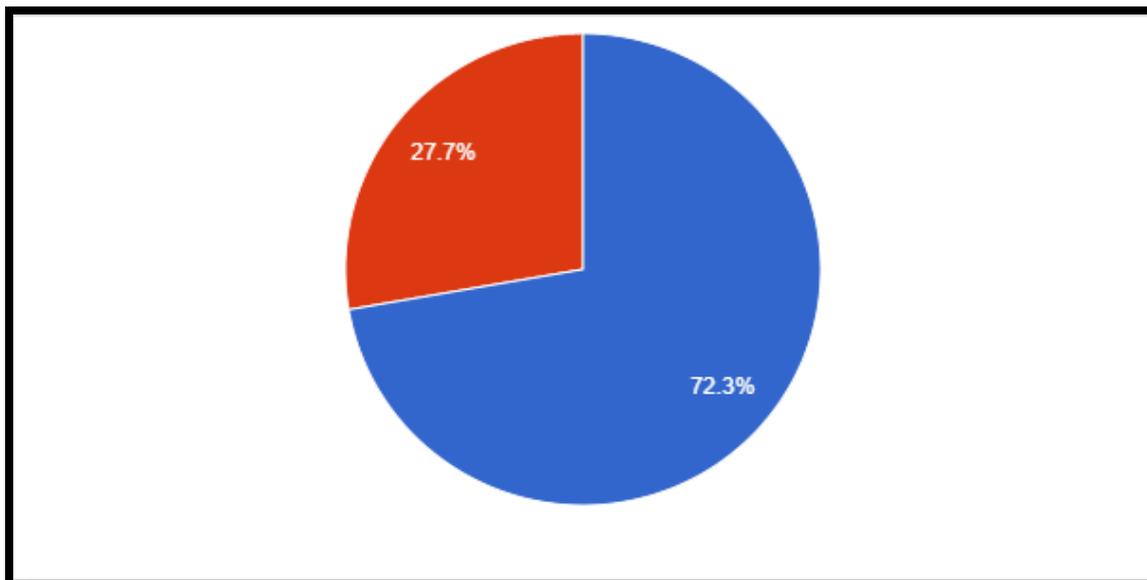
K) **Pacientes que estaban tomando estatinas:** 0 - No (90, 75.6%), 1 - Si (29, 24.4%), 9 - Desconocido (0, 0.0%)



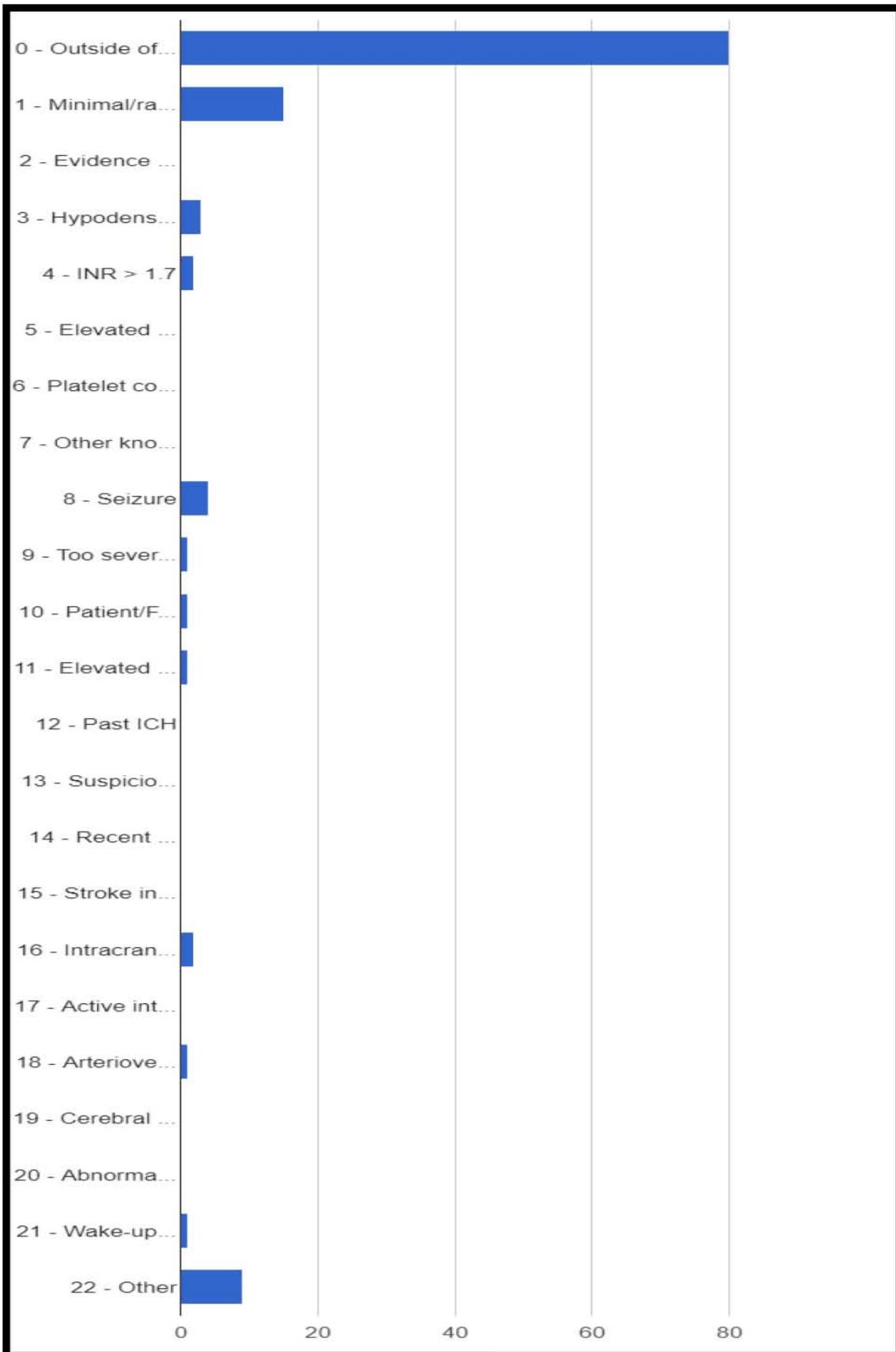
A continuación, mostramos todos los datos de la evaluación que se hizo de los pacientes en el cuadro agudo, además de presentar el tiempo que tardamos en iniciar las dosis de tPA y sus respectivos promedios. Nos parece más demostrativo mostrar en algunos de estos casos algunas gráficas de dispersión con los datos conjuntos.

Todos los pacientes tienen bien documentada la fecha y hora en la que sucedió el ictus, así como la fecha perfectamente bien registrada en a que realizamos el NIHSS basal, la primera imagen y el NIHSS a las 24 horas de sucedido el evento.

A) Pacientes que recibieron tratamiento con tPA intravenoso y pacientes que no fueron candidatos a este: 0 - No (86, 72.3%), 1 - Si (33, 27.7%)



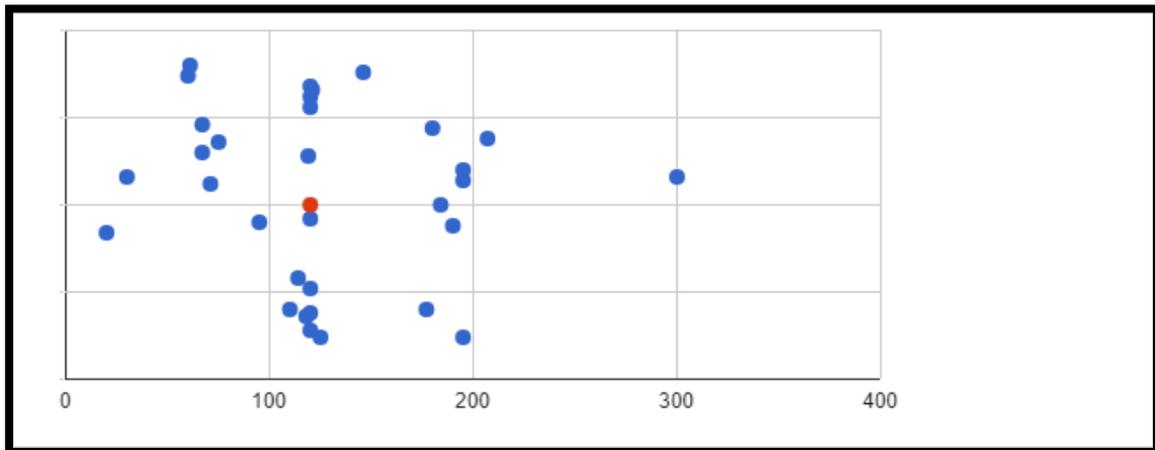
- i) **Causas por las cuales el 72.3% de los pacientes no fueron candidatos a tratamiento con tPA intravenoso:** 0 – Fuera de ventana (80, 93.0%), 1 – Síntomas mínimos o rápida mejoría (15, 17.4%), 2 – Evidencia de hemorragia intracraneal (0, 0.0%), 3 – Hipodensidad en la tomografía computada de inicio (3, 3.5%), 4 - INR > 1.7 (2, 2.3%), 5 – TTP elevado (0, 0.0%), 6 - Plaquetas < 100 (0, 0.0%), 7 – Otros sitios de sangrado desconocidos (0, 0.0%), 8 – Crisis convulsivas (4, 4.7%), 9 – Déficit neurológico muy grave (1, 1.2%), 10 – El paciente o la familia se opuso (1, 1.2%), 11 – Presión arterial elevada (1, 1.2%), 12 – Antecedente de hemorragia cerebral (0, 0.0%), 13 – Sospecha de hemorragia subaracnoidea (0, 0.0%), 14 – cirugía mayor previa (previous 2 weeks) (0, 0.0%), 15 – EVCi en los 3 meses previos (0, 0.0%), 16 – Neoplasia intracraneal (2, 2.3%), 17 – Sangrado interno activo (0, 0.0%), 18 – Malformación arteriovenosa (1, 1.2%), 19 – Aneurisma cerebral (0, 0.0%), 20 – Niveles de glucosa anormales (0, 0.0%), 21 – EVC del despertar (1, 1.2%), 22 - Otros (9, 10.5%).



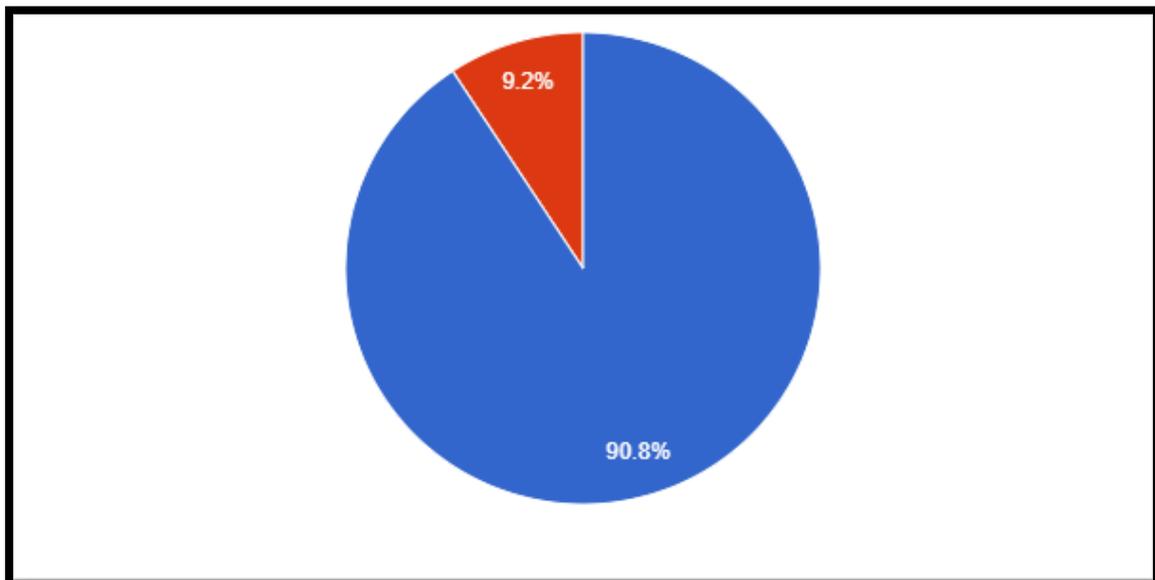
B) **Tiempo** calculado en minutos en el que se inició el bolo de tPA intravenoso desde la llegada del paciente:

Total Count (N)	Missing	Unique	Min	Max	Mean	StDev	Sum	Percentile						
								0.05	0.10	0.25	0.50 Median	0.75	0.90	0.95
32	87 (73.1%)	23	20.00	300.00	126.94	58.98	4,062.00	46.50	61.60	90.00	120.00	177.75	195.00	200.40

Lowest values: 20, 30, 60, 61, 67
Highest values: 195, 195, 195, 207, 300



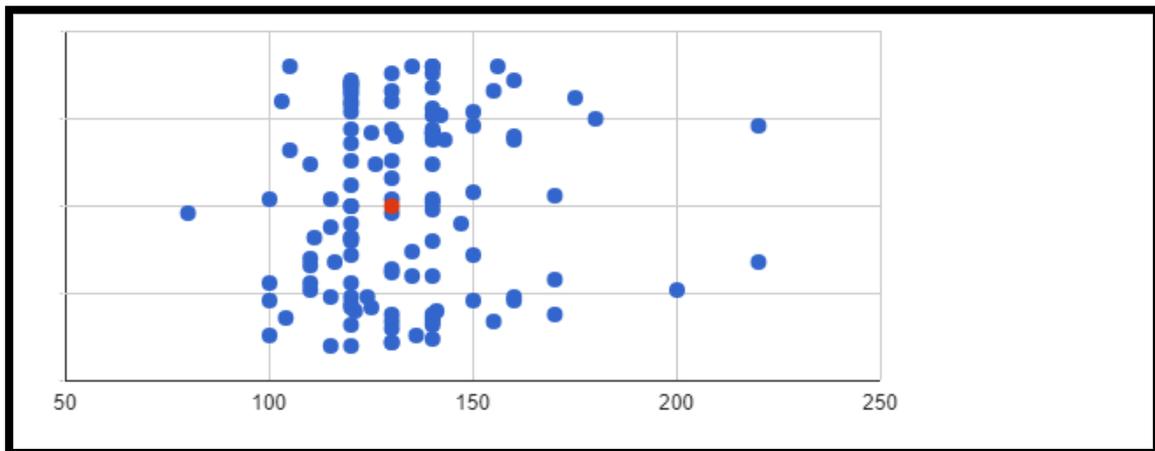
C) **Pacientes que fueron tratados posteriormente con terapia endovascular:** 0 - No (108, 90.8%), 1 - Si (11, 9.2%)



D) **Presión arterial:** Gráfica de dispersión y tabla del promedio de la primera toma de presión arterial (cuando llegó el paciente); En este apartado tomamos en cuenta únicamente la presión arterial sistólica

Total Count (N)	Missing	Unique	Min	Max	Mean	StDev	Sum	Percentile						
								0.05	0.10	0.25	0.50 Median	0.75	0.90	0.95
119	0 (0.0%)	32	80.00	220.00	132.87	21.79	15,811.00	103.90	110.00	120.00	130.00	140.00	160.00	170.00

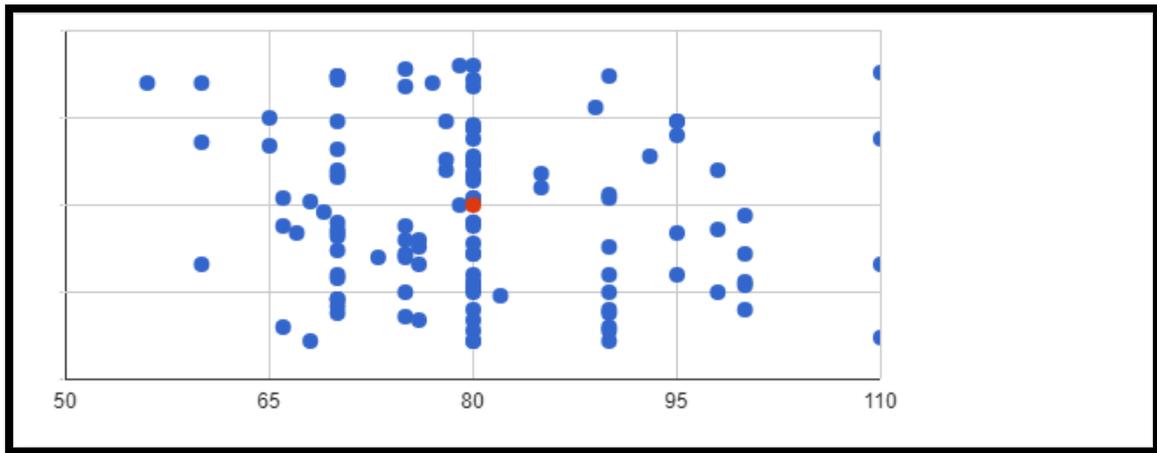
Lowest values: 80, 100, 100, 100, 100
 Highest values: 175, 180, 200, 220, 220



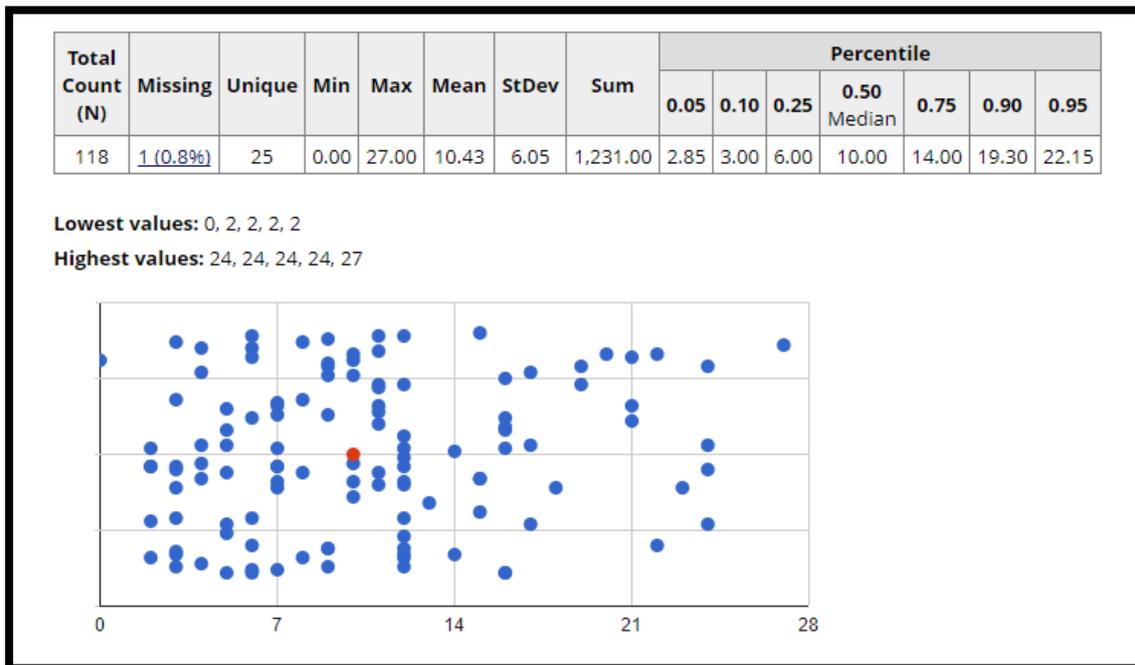
A) **Presión arterial:** Gráfica de dispersión y tabla del promedio de la primera toma de presión arterial (cuando llegó el paciente); En este apartado tomamos en cuenta únicamente la presión arterial diastólica

Total Count (N)	Missing	Unique	Min	Max	Mean	StDev	Sum	Percentile						
								0.05	0.10	0.25	0.50 Median	0.75	0.90	0.95
119	0 (0.0%)	24	56.00	110.00	80.21	11.17	9,545.00	65.90	68.80	70.00	80.00	87.00	95.60	100.00

Lowest values: 56, 60, 60, 60, 65
 Highest values: 100, 110, 110, 110, 110



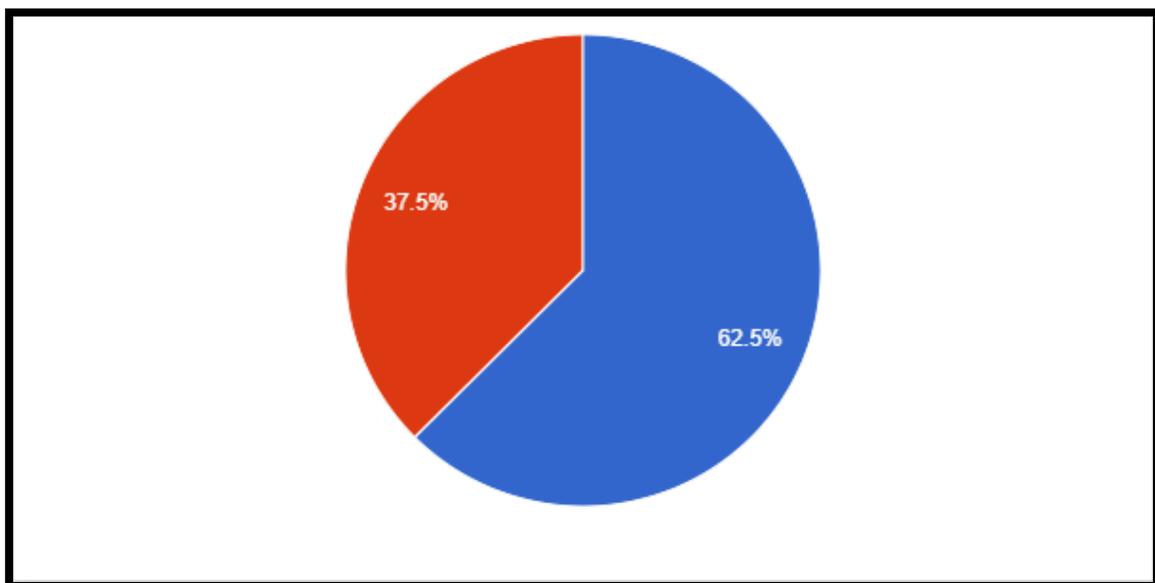
Como hicimos mención con anterioridad, todos los pacientes que fueron recibidos en Urgencias con sospecha de EVCia se les realizó una valoración con base en el NIHSS; por tal razón, mostramos los rangos de NIHSS que tuvieron los pacientes al llegar a emergencias. **NIHSS total:**



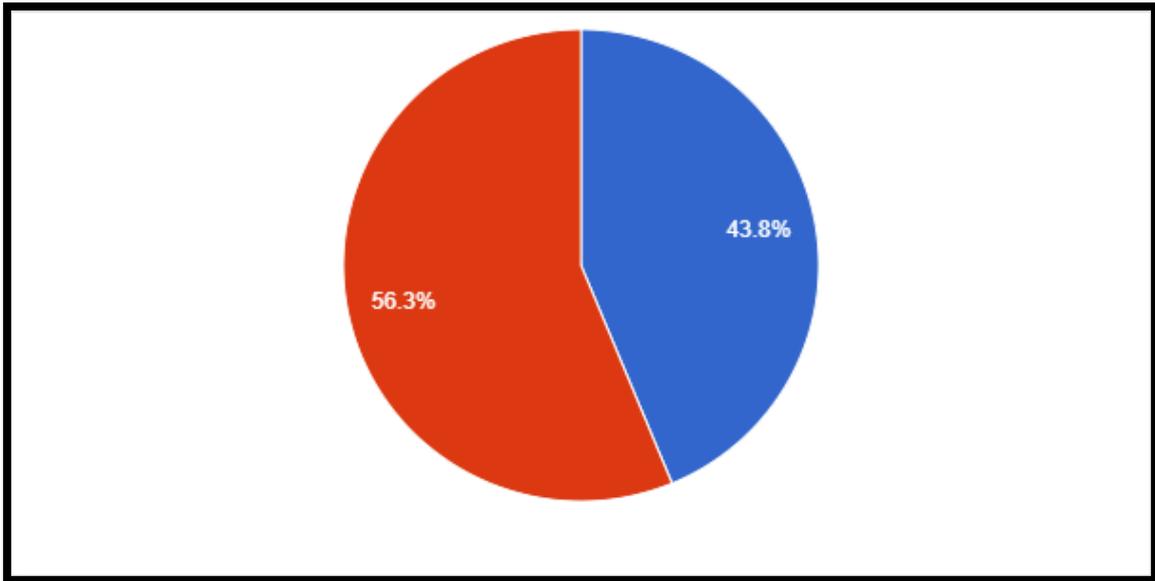
Debido a numerosos elementos que son tema de otro proyecto de investigación y, que no fue menester de esta subvención, el tiempo que tarda un paciente en México en detectar los datos clínicos de un ictus y el periodo que transcurre para llegar a algún servicio de Urgencias es extenso, por eso son pocos los enfermos que logramos trombolizar en periodo de ventana y, a los que captamos en este espacio, están tendientes a encontrarse limítrofes a la fase fuera de tratamiento. Eso nos llevó a especular que las complicaciones neurológicas que suceden con

los pacientes que reciben tratamiento intravenoso con tPA son mayores y más graves. Por tal razón, revelamos los siguientes datos: de todos los pacientes a los que se les realizó trombolisis, solamente el 13.4% (n=16) presentaron algún tipo de complicación (grafica de complicaciones). Estas se dividieron en las siguientes categorías: Transformación hemorrágica, tipo de transformación hemorrágica, desviación de la línea media y si esa desviación era mayor a 5 mm; edema cerebral, deterioro clínico asociado al edema cerebral; si el paciente recibió tratamiento con soluciones hipertónicas y/o se sometió a craniectomía; Presencia de crisis convulsivas y deterioro clínico sin causa aparente o desconocida (a continuación, mostramos las siguientes graficas; en color naranja se mostrarán todos los “Sí” y en color azul “No”).

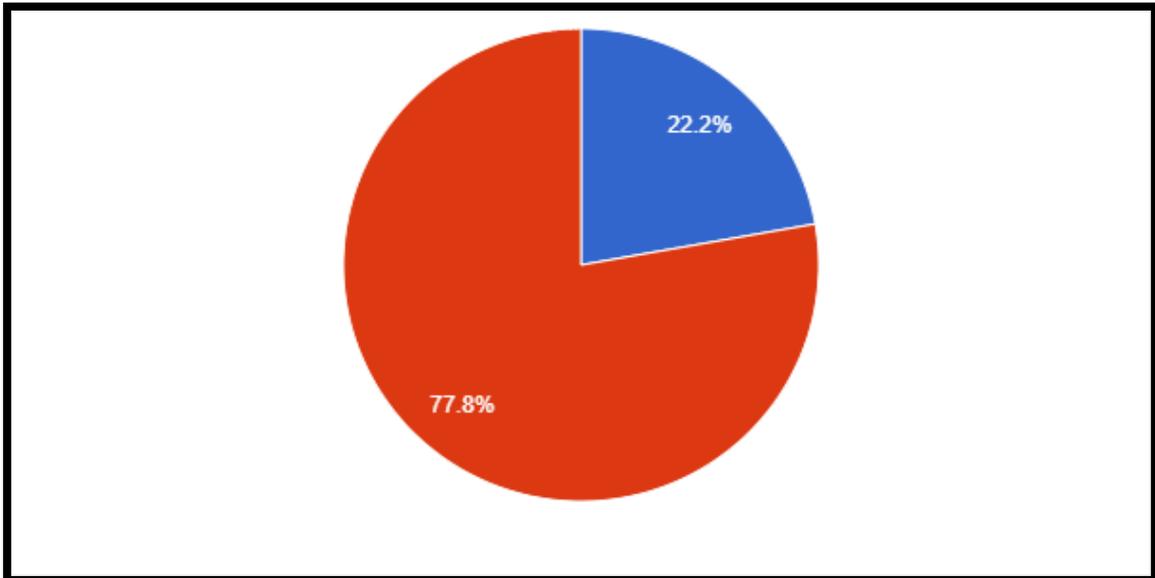
A) Transformación hemorrágica



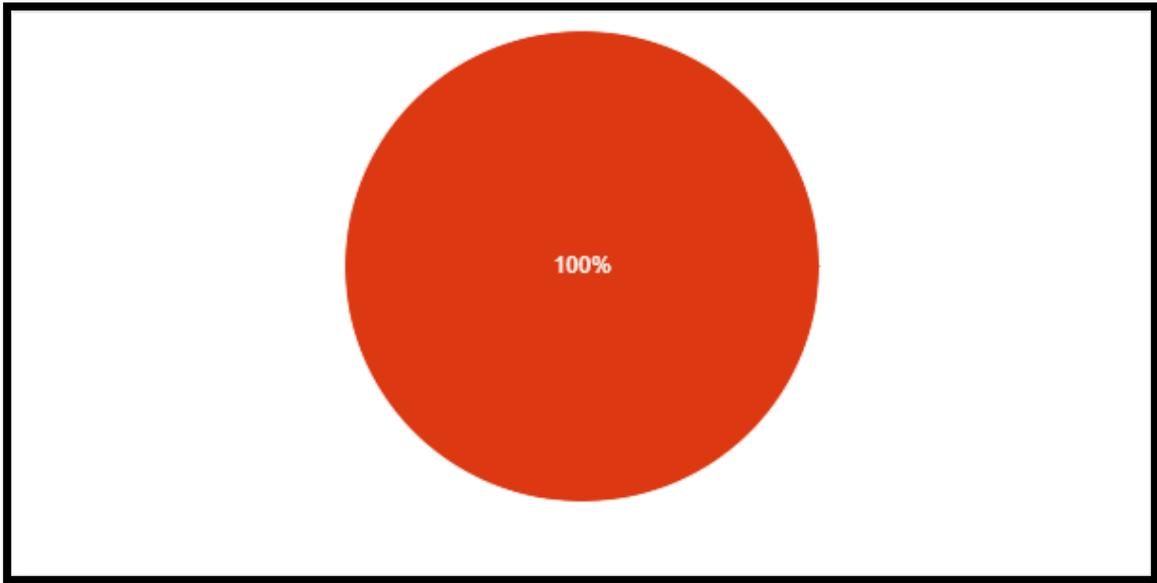
B) Desviación de la línea media presente en imagen



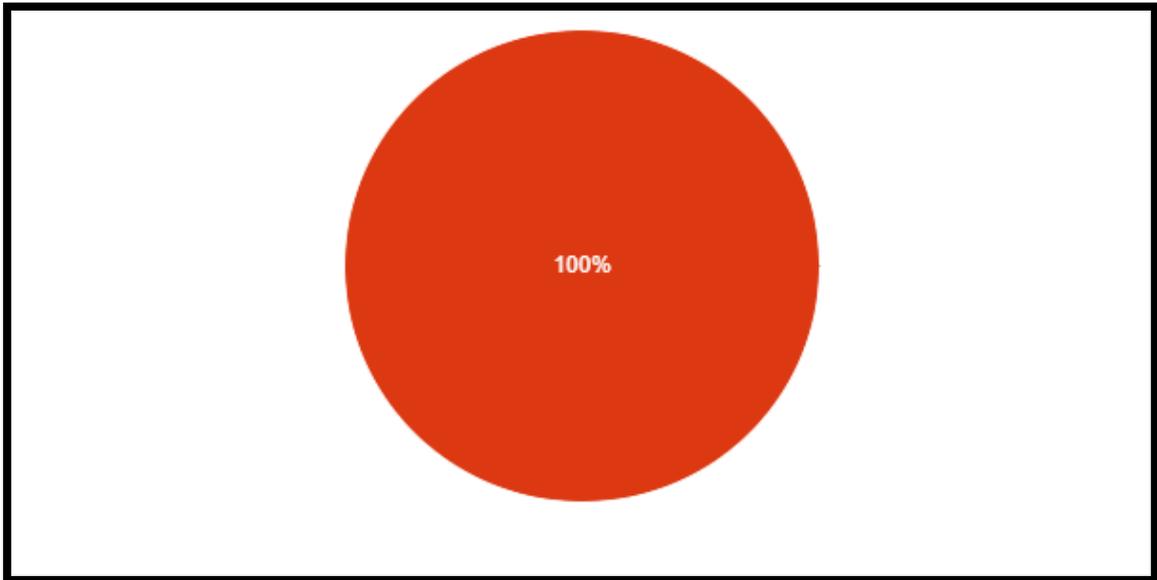
C) Desviación mayor a 5 mm



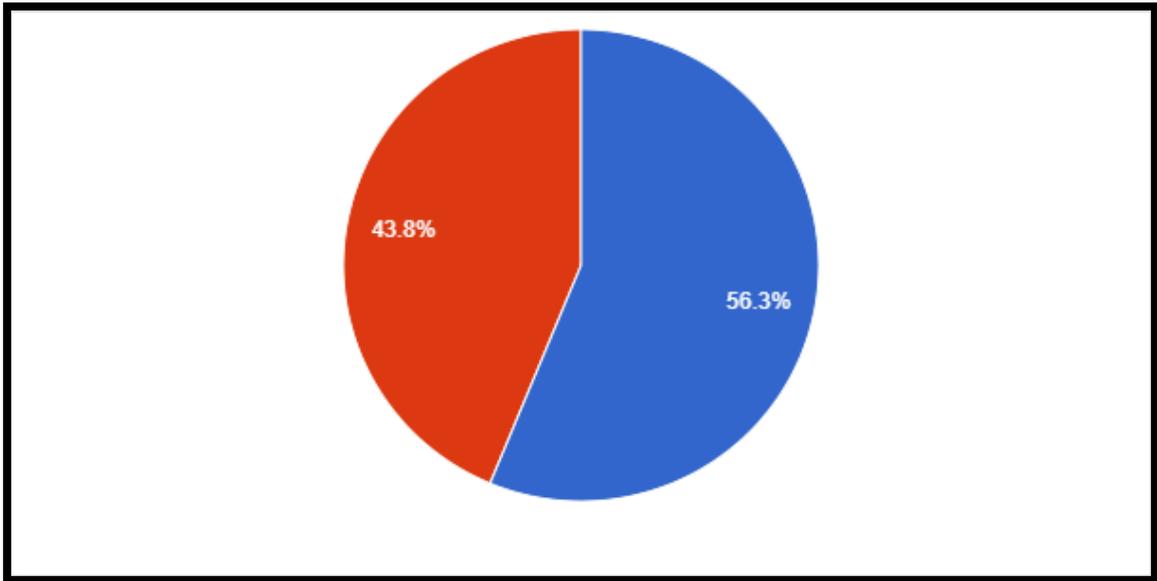
D) Deterioro clínico asociado con la formación del edema (evaluado tanto por NIHSS como por escala de coma de Glasgow)



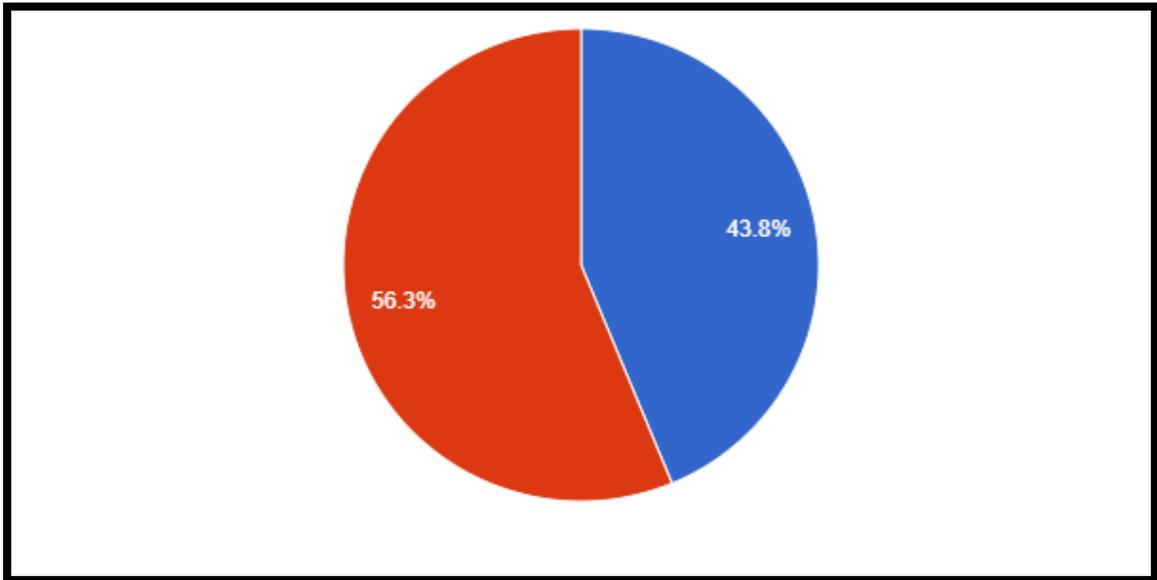
E) Pacientes que recibieron tratamiento hiperosmótico



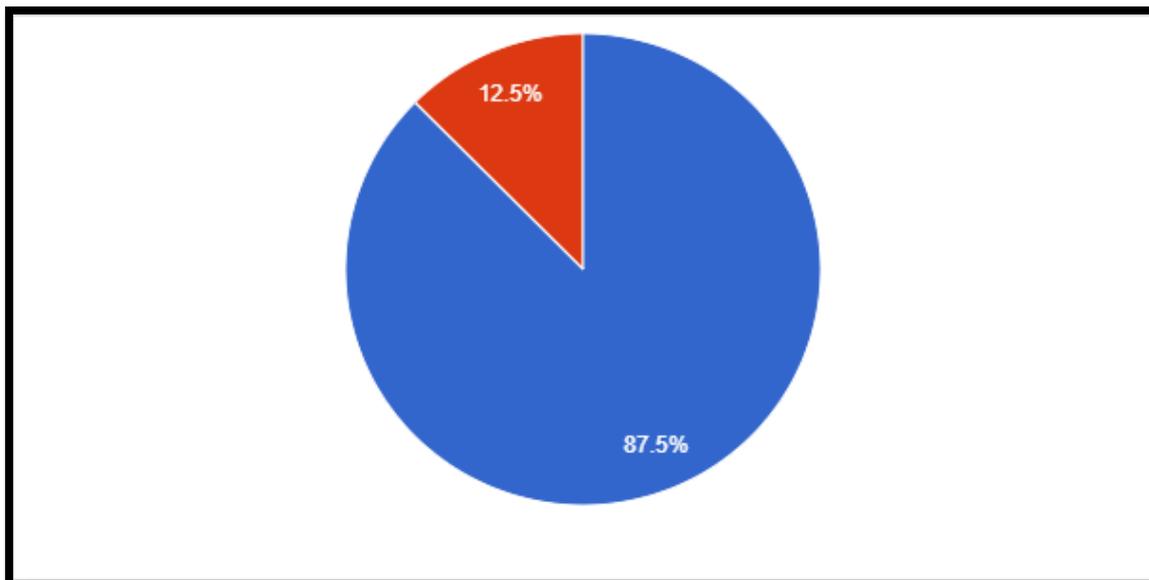
F) Pacientes a los que se les tuvo que someter a hemicraniectomía



G) Pacientes que presentaron crisis convulsivas

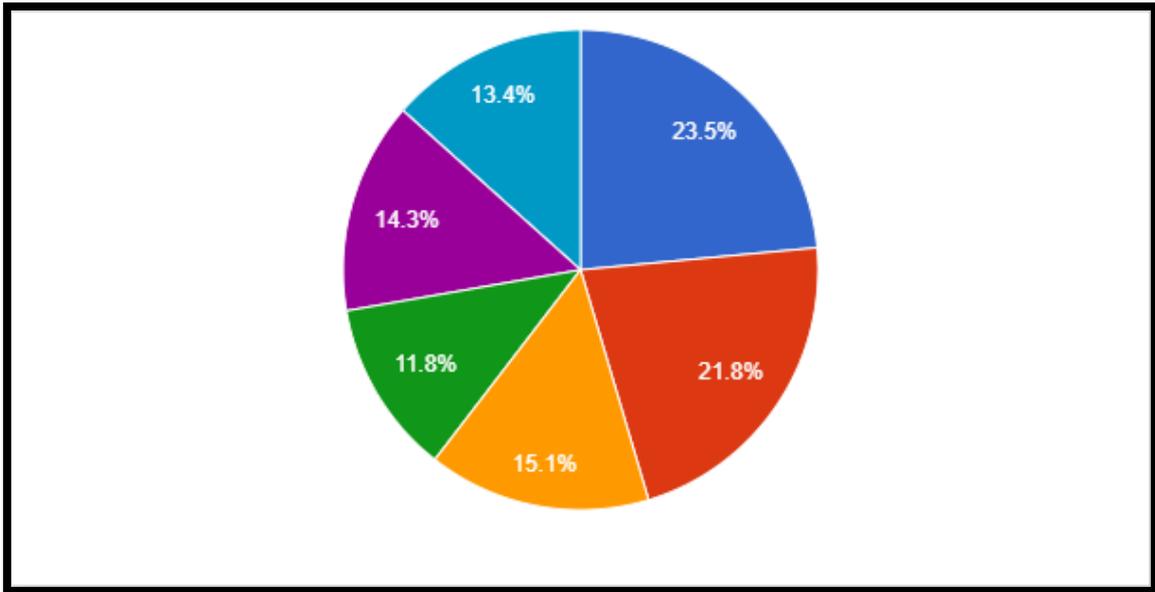


H) Pacientes que sufrieron deterioro por causa desconocida

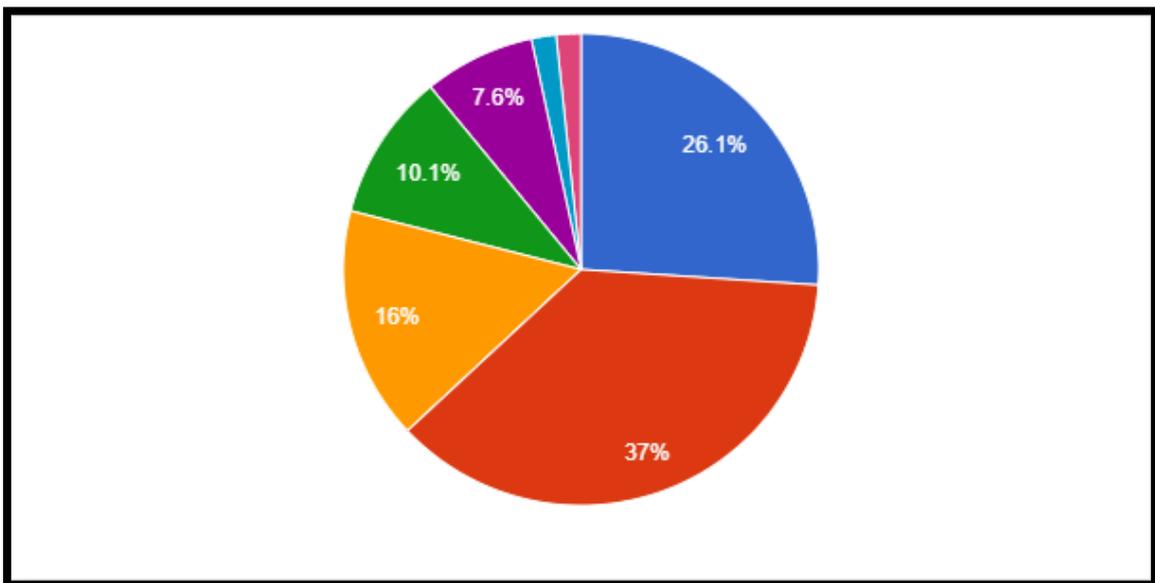


Únicamente, el 1.7% (n=2) de los pacientes murieron estando internados en el Instituto y a causa del ictus.

Toda nuestra población de pacientes fue evaluada con la clasificación **TOAST** para determinar el probable origen del ictus. No omito mencionar las características de dicha categorización con los respectivos porcentajes que obtuvimos en nuestra muestra: Aterosclerosis de grandes vasos (28, 23.5%), Cardioembolismo (26, 21.8%), Enfermedad de pequeño vaso (18, 15.1%), EVC por otra causa bien determinada (14, 11.8%), EVC por causa indeterminada (17, 14.3%) y Desconocido (16, 13.4%).



A todo este grupo de pacientes se les dio seguimiento 90 días después y se evaluaron con la escala funcional mRS. Esta información se obtuvo de dos formas distintas. La primera fue con las anotaciones que se encontraron en el expediente, y la segunda fue con el paciente de forma presencial (en aquellos en los que el suceso fue relativamente reciente). Los resultados fueron los siguientes: 0 (31, 26.1%), 1 (44, 37.0%), 2 (19, 16.0%), 3 (12, 10.1%), 4 (9, 7.6%), 5 (2, 1.7%), 6 (2, 1.7%).



Discusión:

A pesar de que el EVCi es una causa de muerte con alta prevalencia y, sobre todo, el principal factor de incapacidad en personas económicamente activas, al ser nosotros un centro de referencia nacional, tenemos acceso a múltiples casos de ictus isquémico que llegan con posibilidad de rescate vascular. Si bien es cierto, que la mayoría de los pacientes que llegan a nuestro Hospital no tienen la fortuna de recibir terapia intravenosa por encontrarse fuera del periodo de ventana, aquellos que si reciben tratamiento tienen buenos resultados en su mayoría. No solo eso, sino que también, la mayoría de los pacientes – por no decir todos – que llegan a nuestro Instituto reciben seguimiento posterior y prevención secundaria. Será tema de otro estudio evaluar las recurrencias de EVCi en pacientes que hayan sido atendidos con antelación en nuestro centro.

Conclusiones

Este trabajo está hecho con el fin de demostrar dos sucesos: 1) La posibilidad de encontrar una asociación genética que pueda predecir los desenlaces a corto plazo en los pacientes que sufren un ictus isquémico, sean tratados o no tratados. En la población que tiene la suerte de llegar a un servicio de urgencias, que logre ser identificado con esta entidad y tratado dentro de un periodo no mayor a las 4.5 horas, también buscamos ofrecer factores genéticos predictores objetivos para abrir el panorama del paciente y de la familia de la posibilidad que tiene en ese momento el enfermo de sufrir alguna complicación o salir adelante. El proyecto GENISIS es una base bien sustentada, multicéntrica, con un número amplísimo de pacientes que sustenta el principio de una situación que, aunque en este momento se antoje complejo en cuanto a logística y costos, a mediano plazo podría ser la piedra angular del pronóstico y con ello tratamiento de la segunda enfermedad con mayor morbi-mortalidad a nivel mundial.

Como hemos dicho antes, la enfermedad vascular cerebral de tipo isquémico no solo es uno de los mayores problemas en cuanto a costos de salud y mortalidad, sino que también representa la enfermedad que mayor discapacidad ocasiona en las personas económicamente activas, so la importancia de la búsqueda de factores genéticos predisponentes y con impacto directo en el pronóstico. 2) En

cuanto a la epidemiología del EVC isquémico en México, es evidente que la mayoría de las personas que experimentan un ictus isquémico en el momento de su llegada al Hospital – cualquiera que este sea – está fuera de periodo de ventana. Las causas pueden ser vastas, por ejemplo, la poca difusión que tiene esta enfermedad en medios de información y campañas de salud para su detección a pesar de existir la escala de Cincinnati que deja muy claro los síntomas de inicio y la necesidad de acudir en ese momento al servicio de emergencias más cercano. Otra causa no menos importante es la población actual de México, constando esta de 120 millones de habitantes – 20 de ellos en la Ciudad de México y zona metropolitana – esto implica tránsito excesivo prácticamente a cualquier hora del día, cortos recorridos en distancia en periodos de tiempo prolongados. México continúa siendo un país en vías de desarrollo, esto ocasiona que muchos de los hospitales de segundo nivel y, sin temor a equivocarnos, ninguna clínica de primer nivel es capaz de identificar el cuadro agudo del ictus y llevarlo a un abordaje diagnóstico veloz y resolver la situación con alteplasa. Muchos de los centros de segundo nivel no cuentan, siquiera, con un tomógrafo. Sin embargo, algo que muestra este trabajo es que el porcentaje de pacientes que llega en periodo de ventana a centros de alta especialidad como el nuestro (Instituto Nacional de Neurología), obtienen una evaluación adecuada y un proceso de abordaje y tratamiento satisfactoria y benéfica para su pronóstico funcional y de letalidad, siendo mínimo el porcentaje de complicaciones que presentan cuando logramos estandarizarlos correctamente en cuanto al tiempo de inicio de los síntomas.

Hay mucho por hacer a nivel gubernamental y local (cada uno de los centros de atención médica), mientras que en países bien desarrollados los estudios que están corriendo en este momento evalúan que pacientes se ven más favorecidos cuando ellos o su entorno detecta los síntomas de ictus, si los que acuden al centro de salud más cercano para ser tratados y posteriormente enviados a un Hospital de tercer nivel para abordaje por terapia endovascular, o los que acuden directamente a Hospitales de tercer nivel, en México desafortunadamente son pocos los sitios que tienen la capacidad de hacer diagnóstico correcto y tratar, dentro de los estándares establecidos, de forma adecuada a los enfermos.

Bibliografía

1. Genetic of Early Neurological inStability after Ischemic Stroke (GENISIS). Protocol 2, versión 1. June 24, 2015
2. The attached protocol is a participating site protocol for “Stroke Center Biospecimen and Genomic Outcome/Recovery Scales Repository” (IRB # 201104001).
3. <http://www.genome.gov/gwastudies>
4. Continuum (Minneap Minn) 2017;23(1):15–39
5. O’Carroll CB, Barrett KM. Cardioembolic stroke. Continuum (Minneap Minn) 2017; 23(1 Cerebrovascular Disease): XXYXX
6. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke StatisticsV2016 Update: a report from the American Heart Association. Circulation 2016;133(4):e38Ye60
7. Howard VJ, McClure LA, Meschia JF, et al. High prevalence of stroke symptoms among persons without a diagnosis of stroke or transient ischemic attack in a general population: the REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke (REGARDS) study. Arch Intern Med 2006;166(18)
8. Feng W, Hendry RM, Adams RJ. Risk of recurrent stroke, myocardial infarction, or death in hospitalized stroke patients. Neurology 2010;74(7):588Y593
9. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke 2014;45(7):2160Y2236
10. Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G, et al. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. Lancet Neurol 2008;7(10):915Y926
11. SPRINT Research Group, Wright JT Jr, Williamson JD, et al. A randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control. N Engl J Med 2015;373(22)
12. Bushnell C, McCullough LD, Awad IA, et al. Guidelines for the prevention of stroke in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke 2014;45(5):1545Y1588
13. Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, et al. Guidelinesfortheprimarypreventionofstroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke 2014;45(12)
14. Boffetta P, Straif K. Use of smokeless tobacco and risk of myocardial infarction and stroke: systematic review with meta-analysis. BMJ 2009;339:b3060
15. Battey et al The ISGC, Part 2: Biological Sample Storage
16. Continuum (Minneap Minn) 2017;23(1):62–81
17. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke 2013; 44(3):870Y947
18. ClinicalTrials.gov. Stroke Hyperglycemia Insulin Network Effort (SHINE) Trial
19. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. N Engl J Med 1995;333(24):1581Y1587
20. Wahlgren N, Ahmed N, Da ´valos A, et al. Thrombolysiswithalteplaseforacuteischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. Lancet 2007;369(9558)
21. ACTIVASE (alteplase). Prescribing information. [gene.com/download/pdf/activase_prescribing.pdf](http://www.genecor.com/download/pdf/activase_prescribing.pdf). Accessed December 1, 2016
22. ClinicalTrials.gov. PerfusiOn Imaging Selection of Ischemic STroke Patients for EndoVascular ThErapy (POSITIVE).

23. ClinicalTrials.gov. Endovascular Therapy Following Imaging Evaluation for Ischemic Stroke 3 (DEFUSE 3).
24. ClinicalTrials.gov. A Study of the Efficacy and Safety of Activase (Alteplase) in Patients With Mild Stroke (PRISMS)