



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS EN LA CADENA ALFA 2 DEL COLÁGENO TIPO 1
(COL1A2) EN PACIENTES MESTIZO-MEXICANOS CON ANEURISMA CEREBRAL**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA
EN NEUROLOGÍA**

PRESENTA

Juan José Méndez Gallardo

TUTOR DE TESIS

Ángel Antonio Arauz Góngora



Ciudad de México, agosto del 2018



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.



DR. PABLO LEON ORTIZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

José Fernando Zermeño Pöhls
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUROLOGÍA

Ángel Antonio Arauz Góngora
TUTOR DE TESIS

En este trabajo también participaron:

Dra. María Alejandra González Patiño

Investigadora adjunta

Dra. Petra Yescas Gómez

Investigadora adjunta

Agradecimientos:

A mi familia – el pilar central de mi formación como médico y como persona. Todo lo que hago y que he logrado ha sido gracias a estas cuatro personas.

Dr. Arauz por sacarme adelante a pesar de mí. La paciencia y el conocimiento con el cual me ha guiado a lo largo de estos tres años son cosas por las que siempre estaré en deuda con usted.

Mis residentes de mayor jerarquía de los últimos dos años: gracias por las clases, gracias por las guardias y gracias por la amistad.

Mis compañeros de generación. Tantas personas y ni uno solo que no me haya aportado muchísimo.

Mi Instituto. No hay otro logro que me enorgullezca más que llamar al INNN mi hogar.

INDICE

1. Resumen de la Investigación
2. Antecedentes
3. Planteamiento del Problema
4. Hipótesis
5. Objetivos
6. Justificación
7. Metodología
 - Casos
 - Controles
 - Identificación de Polimorfismos
 - Definición Operacional de Variables
8. Análisis Estadístico
9. Consideraciones Éticas
10. Resultados
11. Discusión.
12. Referencias Bibliográficas
13. Apéndices
 - Apéndice 1: Carta de Consentimiento Informado Casos
 - Apéndice 2: Carta de Consentimiento Informado Controles

Prevalencia de polimorfismos en la cadena alfa 2 del colágeno tipo 1 (COL1A2) en pacientes mestizo-mexicanos con aneurisma cerebral

RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA

Los aneurismas intracraneales (AI) son una anomalía vascular que se caracteriza por el abombamiento local de una arteria intracraneal. Se estima que tienen una prevalencia de aproximadamente el 2.7–6.5% en la población general¹. Se consideran una enfermedad multigénica, aunque se le ha relacionado con factores de riesgo modificables comunes, como lo son la hipertensión arterial sistémica y el tabaquismo². Aquellos con familiares de primer grado tienen un riesgo de rotura hasta 4 veces mayor cuando se les compara con la población general, y el riesgo se incrementa hasta 6 veces en estudios de hermanos³.

Respecto al riesgo de rotura, se estima que esto ocurre a una frecuencia de aproximadamente 1% por año, lo cual tiene consecuencias clínicas graves en el 35 al 50% de los pacientes¹. La rotura del aneurisma representa el 80% de los casos de hemorragia subaracnoidea (HSA) y hasta el 5% de todos los casos de enfermedad vascular cerebral⁴. Además, se ha observado que el riesgo de rotura difiere entre distintas razas y etnias, con mayor riesgo de HSA aneurismática en negros afroamericanos e hispanos, en comparación con blancos⁵. Hablando de cifras en México, en un estudio multicéntrico observacional se observó que la mediana de estancia hospitalaria era de 5 días, con una mortalidad del 17.1% a los 30 días, de lo cual el 29.3% fue por HSA⁶. Además, se ha encontrado que AI se presentan en una pequeña porción de pacientes en el contexto de enfermedades hereditarias del tejido conectivo, como lo son síndrome de Ehler-Danlos tipo IV, síndrome de Marfan, síndrome de Alport y enfermedad renal poliquística¹.

Con el paso del tiempo se ha logrado ahondar en el aspecto genético de la formación de aneurismas intracraneales, particularmente en poblaciones asiáticas, como lo son la china, coreana y japonesa. El gen COL1A2 (Fig. 1) está conformado por 52 exones y se sitúa en el cromosoma 7q22.1, su tamaño es de 38 kb y codifica para 1 366 aminoácidos. El colágeno tipo 1 es un heterotrímero compuesto de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ ⁷. Este gen fue analizado en una población japonesa de 21 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), en 115 pacientes con enfermedad familiar y en 145 con enfermedad esporádica. Tres SNPs distintos mostraron diferencias importantes en frecuencias alélicas entre casos y controles, especialmente cuando se valoraba un SNP que resultaba en una sustitución de aminoácido en los casos familiares. Se concluyeron dos cosas: 1) este SNP podría ser una variante funcional necesaria para el desarrollo de aneurismas intracraneales, y 2) aun así, ya que la frecuencia del alelo del SNP es baja (5.2% en la población de aneurismas intracraneales versus 2.7% en la población de control), este solo puede explicar una porción pequeña de los casos entre pacientes japoneses⁸.

El gen COL1A2 se ha visto relacionado con la patogénesis de AI desde hace varios años. Peters y cols observaron una sobreexpresión importante de COL1A2 en AI usando la arteria temporal superficial como control⁹. De entre varios estudios el principal objetivo ha sido rs42524 –un SNP localizado en el exón 28–, estudiado primero en Japón y después validado en una población china¹⁰, que también ha sido estudiado en Alemania con resultados de significancia estadística para asociación a AI¹¹. Sin embargo, varios otros estudios han fracasado al intentar replicar esta asociación¹². Un metaanálisis reciente sugiere que COL1A2 rs42524 es un factor de riesgo importante para susceptibilidad a AI, con un efecto especialmente fuerte en personas asiáticas¹. Además, se sabe que el pronóstico tras la rotura de un aneurisma es malo: el 50% de los pacientes muere en el primer mes, el 25% sufre algún grado de discapacidad de manera permanente y el 25% restante persiste con riesgo de resangrado; en cambio, en aquellos que se someten a clipaje de un aneurisma no roto la mortalidad y morbilidad disminuirán a <2.5% y <6%, respectivamente¹³.

Objetivo: identificar la prevalencia del polimorfismo rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2 en pacientes mestizo-mexicanos con aneurismas intracraneales.

Hipótesis: el polimorfismo rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2 tiene una prevalencia estadísticamente significativa en pacientes mestizo-mexicanos con aneurisma intracraneal

Metodología: se reclutaron 97 sujetos con diagnóstico confirmado de aneurisma intracraneal y se tomaron muestras de sangre para recabar material genético. La determinación de los genotipos se realizó mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR) de punto final previo diseño de los *primers*. La genotipificación de la variante polimórfica rs42524 se realizó por secuenciación.

Resultados: de los 97 pacientes, 24 eran hombres y 73 mujeres, y tenían una media de edad de 51 años (DE 15). De estos, 77 (79.4%) sufrieron de hemorragia subaracnoidea por ruptura aneurismática (HSA). El principal síntoma fue cefalea en 73 de los pacientes. En el 27.4% se diagnosticó enfermedad aneurismática múltiple. Los aneurismas se detectaron más frecuentemente en la arteria comunicante anterior (21.6%), arteria cerebral media derecha (15.5%) y el segmento comunicante posterior de la arteria carótida interna izquierda (11.3%).

De entre los antecedentes, los más importantes fueron hipertensión arterial sistémica en el 45.4% (n=44) y tabaquismo en el 37.7% (n=23).

Encontramos que del 79.4% de los aneurismas rotos, el 75.4% (n=46) correspondían al genotipo GG, el 32.5% al GC y 7.8% de variedad CC. Realizamos una tabla de contingencia y prueba de chi-cuadrada para aquellos con un genotipo heterocigoto GG para el rs42524 en el exón 28, con reporte de un OR 1.76 (IC 95% 0.22 – 1.42). No se encontró relación con el genotipo del polimorfismo y el desenlace (muerte, Rankin al egreso o complicaciones del procedimiento realizado).

Prevalencia de polimorfismos en la cadena alfa 2 del colágeno tipo 1 (COL1A2) en pacientes mestizo-mexicanos con aneurisma cerebral

ANTECEDENTES

Introducción

Dentro del grupo de las arteriopatías no ateroscleróticas se incluyen los aneurismas intracraneales (AI), la disección cervical, displasia fibromuscular y la enfermedad de moyamoya. Se sabe que todas estas patologías comparten asociaciones, en especial en cuanto a fenotipos poligenéticos. Así es que tras muchos análisis y estudios experimentales podemos entender mejor su etiología, patología y enfocarnos en el tratamiento y obviamente en la prevención de las mismas¹⁴.

En un artículo de Yoneyama y cols se reporta que los genes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, familias de colágeno, elastina y otros más se encontraban sobreexpresados en AI. Debido a que el gen del colágeno alfa 2 de tipo 1 (COL1A2) estaba sobreexpresado en AI y localizado en 7q22.1, que es en donde se encontró la mejor evidencia sugestiva de una relación, se consideró que COL1A2 podría ser un candidato posicional y funcional para AI¹⁵.

Entre el 6% y el 8% de todas las enfermedades vasculares son debido a HSA, por lo que se ubica en el cuarto lugar en incidencia dentro de este grupo de enfermedades. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (México) se reportó una mortalidad total del 35%¹⁶.

Hoy contamos con más recursos con una mejor capacidad diagnóstica para detectar aneurismas – esto ha llegado a que la enfermedad aneurismática sea diagnosticada de manera más temprana¹⁷. Con todo esto, un aneurisma detectado que llega a romperse tiene una alta tasa de morbimortalidad, haya sido detectado tempranamente o no, y es por ello que requerimos de marcadores que nos indiquen cuándo es que un paciente tiene el riesgo de desarrollar esta entidad. Por todo lo anterior, consideramos que el primer paso para lograr esto en la población mexicana es el reconocimiento de un polimorfismo lo suficientemente frecuente en nuestro país.

Aspectos epidemiológicos

La HSA de origen aneurismático tiene una mortalidad aproximada del 40%; de estos, hasta el 15% morirán antes de llegar al hospital, el 25% en las primeras 24 horas y el otro 40% en los próximos 7 días. Hasta el 75% de quienes sobreviven cursarán con alguna secuela^{4, 18}. En el estudio mexicano arriba mencionado, en el cual el seguimiento fue de treinta días tras la HSA, la mortalidad registrada fue del 29.3%¹⁹. Las cifras reportadas son las de un

centro de referencia con recursos distintos a los de la mayoría de los hospitales de segundo nivel del país.

En un estudio alemán de 2014 se investigó la presencia del polimorfismo rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2, encontrando que si bien esto se presenta en un subgrupo de la población alemana, este no se encontraba en la mayoría de los casos²⁰. Guías estadounidenses de 2015 reportan que los genes con mayor asociación a la formación de aneurismas son CDKN2BAS y SOX17. Aun así, no se ha encontrado algún factor de riesgo genético predominante²¹.

Fisiopatología

Se sabe que la fisiopatología de la formación de aneurismas es multifactorial¹⁷. Primordialmente se debe a la pérdida de la integridad estructural de la pared arterial, particularmente por degradación de la lámina elástica, alteraciones en la deposición de colágeno y en la composición funcional de las células del músculo liso, además de tener un componente inflamatorio¹⁴. Todo lo anterior se refleja en la migración de las células del músculo liso a la íntima, disfunción de la matriz extracelular y alteración en la relación elastina-colágeno²².

Aproximación genética y aplicaciones clínicas

Por medio de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) se han encontrado asociaciones importantes a la formación de aneurismas en distintos loci cromosómicos, como lo son 7q11, 8q11, 9p21, 13q34, 19q13.3 y Xp22; aún con esta información no se ha logrado dar con algún hallazgo que justifique una parte considerable de los casos^{20, 23, 24}.

Si bien se ha reportado que son en una gran cantidad de condiciones hereditarias son varios los tipos de colágeno los que están afectados²⁵, esto solo explica aproximadamente el 1% de todos los casos de AI reportados hasta el momento, y ni siquiera explican todos los casos de aneurismas con un componente familiar¹⁷.

Sabemos que el colágeno tipo I es el más abundante en el tejido conectivo de vertebrados, y, que junto al colágeno tipo III es un componente esencial de la estructura de las arterias puesto que les confiere una gran capacidad para resistir tracción²⁶. Por ello, las variantes que afectan la composición y distribución del colágeno tipo I repercutirán en la capacidad elástica de la pared arterial¹⁵.

El gen COL1A2 (Figura 1) se compone por 52 exones y está situado en el cromosoma 7q22.1, tiene un tamaño de 38 kb y codifica para 1366 aminoácidos. El colágeno tipo I es un heterotrímero que se compone de 2 cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ ²⁷. Los exones del 6 al 49 codifican para varios aminoácidos, y constituyen la región de triple hélice. A la fecha se han reportado más de 21 tipos de polimorfismos distintos en pacientes con AI, y el número continúa aumentando según se realizan estudios GWAS, de expresión genética y de secuenciación de nueva generación¹⁵. Aún se desconoce el mecanismo por el cual las mutaciones en el gen COL1A2 provocan defectos en la membrana basal²⁸.

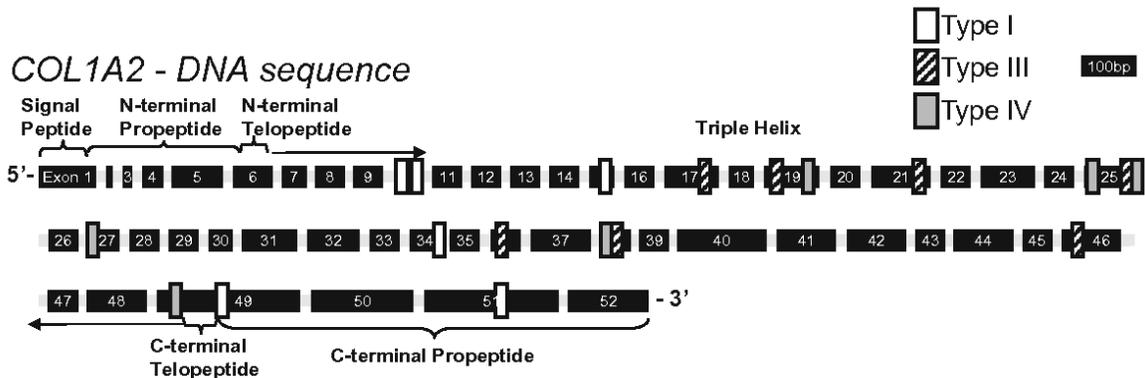


Figura 1: Esquema que de la estructura del gen del colágeno tipo I alfa 2.

Podemos definir un polimorfismo como la ocurrencia de dos o más alelos en un locus de la misma población, cada uno con una frecuencia apreciable; un polimorfismo no puede explicarse por una mutación recurrente ni por inmigración. Un locus polimórfico contiene al menos dos alelos, y cada uno de ellos tiene una frecuencia superior al 1%^{17, 29}. Cuando un alelo tiene una frecuencia menor al 1% se le considera como variante rara²⁹.

Al estudiar polimorfismos de COL1A2, se ha encontrado que estos se relacionan con diversas entidades, como lo son defectos en la densidad ósea²⁹, infarto de miocardio³⁰ y aneurismas cerebrales, con penetrancia variable¹³. Por ello, se considera que el estudio de polimorfismos podría ayudarnos a comprender cuáles son los procesos a nivel de la pared vascular que llevan a la formación de un aneurisma, y a su eventual rotura^{30, 31}.

De entre los polimorfismos más estudiados de COL1A2, el más estudiado –particularmente en Asia y Alemania– es el 28 (rs42524)^{13, 21}. Este polimorfismo ha revelado asociación a AI en un contexto tanto espontáneo como en familiar^{15, 32}. Sin embargo, esto no logró explicar más allá de los casos de un subgrupo de pacientes en Alemania²⁰.

Una hipótesis acerca del por qué los polimorfismos relacionados con el colágeno tipo I se asocian a la formación de aneurismas es la conjunción de: deficiencia extracelular de colágeno normal (o presencia extracelular de colágeno mutante) y acumulación intracelular heterotrimética que resulta ser tóxica para la estructura del vaso. Se considera que para que todo esto ocurra se requiere de sobreexpresión de la mutación en COL1A2³³. Dicho gen se ve regulado a la alta hasta casi 5 veces más en el tejido aneurismático de pacientes con AI intracraneales, comparado con el tejido vascular de la arteria superficial temporal del mismo paciente³⁴.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a los estudios a nivel genético que se han publicado en este siglo, se considera que aquellos con AI podrían tener una condición determinada genéticamente que los vuelve propensos a tener defectos estructurales en la pared del vaso. Al sufrir de rotura aneurismática, hasta la mitad de los pacientes mueren al cabo de 30 días, mientras que de

la otra mitad, un 25% continuará con riesgo de resangrado y el otro 25% vivirá con algún grado de discapacidad de manera permanente¹³.

Aquí se pretende reportar la incidencia en la población mestizo-mexicana de un polimorfismo frecuentemente relacionado con AI: rs42524 en el gen COL1A2. Se recabaron muestras de pacientes con AI.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la prevalencia de polimorfismos en la cadena alfa 2 del colágeno tipo 1 (COL1A2) en pacientes mestizo-mexicanos con aneurismas intracraneales?

HIPÓTESIS

H0: la prevalencia del polimorfismo rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2 es baja en pacientes mestizo-mexicanos que ya se conocen con aneurismas intracraneales

H1: la prevalencia del polimorfismo rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2 es estadísticamente significativa en pacientes mestizo-mexicanos que ya se conocen con aneurismas intracraneales

OBJETIVOS

Objetivo general de la investigación

- Determinar la prevalencia del polimorfismo rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2 en pacientes mestizo-mexicanos que se conocen con aneurismas intracraneales.

JUSTIFICACIÓN

Al detectar un polimorfismo con una frecuencia estadísticamente significativa en México, este estudio será el primer paso para integrar un abordaje genético en pacientes mexicanos con aneurismas intracraneales, para finalmente cumplir una función preventiva.

Investigaciones como esta son importantes ya que la información en la población mexicana respecto a genética y su relación con aneurismas es muy limitada. La gran mayoría de lo que se sabe de este tema es en países y etnias distintas a las de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recabaron muestras de 97 casos y como grupo control se utilizaron los datos de la base HapMap NCBI para el polimorfismo rs42524 en la población mexicana.

Para determinar el tamaño de la muestra se usó la fórmula para calcular muestras en estudios de casos y controles (Figura 2) y corroborando el resultado con el software Epi Info®; donde con un nivel de seguridad de 0.95, poder estadístico del 80%, con un radio de casos y controles 1:1. Frecuencia de exposición entre los controles en controles 0.53 y entre los casos 0.74. Con un OR de 2.52; obteniendo un tamaño muestral mínimo de 91 casos y 91 controles, con una N total de 182.

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

FIGURA 2: fórmula para calcular muestras en estudios de casos y controles

Para este propósito se recolectó ADN de pacientes con diagnóstico de enfermedad aneurismática y controles sanos. Se obtuvieron 3 muestras de sangre periférica en tubos Vacutainer® con anticoagulante ACD (6 ml c/u), de la cual se realizó extracción de ADN por métodos convencionales, previa firma de consentimiento informado. (Apéndice 1 y 2).

CASOS

Pacientes con diagnóstico confirmado de aneurisma cerebral. Pueden haber sido diagnosticados desde enero de 1990 hasta Abril del 2017 por la clínica de enfermedad vascular cerebral o terapia endovascular neurológica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México.

Deben contar con al menos uno de los siguientes estudios: IRM con A-IRM, A-TAC, o angiografía por sustracción digital de los vasos intracraneales donde se haya observado el defecto aneurismático.

Se recabaron datos clínicos como historia médica personal (antecedente de tabaquismo, hipertensión arterial sistémica y diabetes mellitus), curso clínico (Rankin modificado de ingreso y egreso, grados en las escalas de Fisher y Hunt-Hess al ingreso sólo en aneurismas rotos) y complicaciones (vasoespasma, hidrocefalia, entre otras). Las dilataciones aneurismáticas serán categorizadas de acuerdo al territorio de la circulación intracraneal afectado (arteria cerebral anterior, media o posterior) y número (único o múltiple).

Criterios de Inclusión.

1. Diagnóstico confirmado de aneurisma cerebral, diagnosticado por angiorresonancia, angiotomografía, o angiografía por sustracción digital.
2. Edad >18 años.
3. Sin alteraciones vasculares sugestivas de otras etiologías, tales como aterosclerosis, vasculitis o vasculopatía de grandes vasos de origen no ateroscleroso.
4. Ambos padres nacidos en México.
5. Los cuatro abuelos nacidos en México.

Criterios de Exclusión.

1. Aneurisma cerebral causado por un procedimiento endovascular (angiografía, angioplastia, etc.)
2. Desorden del tejido conectivo que pueda predisponer a enfermedad aneurismática.
3. No ser mestizo-mexicano.

Controles.

Se obtendrán controles sanos, pareados por edad (edad \pm 5 años) y género. Los controles serán aquellos pacientes con cuadro de cefalea, que posterior a angioresonancia o angiotomografía no presenten hallazgos de malformaciones vasculares corroboradas por neurorradiología del Instituto de Neurología y/o el Instituto Nacional de Nutrición.

Criterios de Inclusión:

1. Individuos sin historia de enfermedad vascular (infarto al miocardio, enfermedad vascular cerebral y enfermedad vascular periférica).
2. Sin antecedente de aneurisma cerebral.
3. Familiares no consanguíneos de los casos.
4. Edad de >18 años.
5. Ambos padres nacidos en México.
6. Los cuatro abuelos nacidos en México.

Criterios de Exclusión.

1. Que padezcan un desorden del tejido conectivo que pueda predisponer a aneurismas cerebrales.
2. No ser mestizo-mexicano.
3. Con antecedente de aneurisma cerebral.

IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO rs42524 EN EL EXÓN 28 DEL GEN COL1A2

A las 3 muestras de sangre periférica obtenidas en tubos Vacutainer® con anticoagulante ACD (6 ml c/u), de los casos y controles, previa firma de consentimiento informado, se le asignó un número seriado para su identificación.

Posterior a centrifugación se decidió generar un pool de células blancas (buffy coat) para la extracción del ADN. Permaneciendo las muestras en congelación y almacenadas a -80° C hasta su análisis.

El ADN se extrajo de las muestras de sangre periférica por método de *salting* y también utilizando el kit de purificación de QIAGEN®, de acuerdo a las condiciones establecidas por el proveedor.

Todas las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría, por medio del Nanodrop (Bibby Scientific lid Stone, modelo GENOVA NANO, Serial 39949) determinándose la relación 260/280 y la concentración se estableció en ng/ml. La calidad se evaluó mediante geles de agarosa al 1%/TBE1X, a 100V por 1 hora.

La determinación de los genotipos se realizó mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR) de punto final previo diseño de los *primers* como se muestra a continuación:

- Región utilizada para el diseño, utilizando la base de datos de www.ensembl.org.org y utilizando el programa de diseño Primer3Plus www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi:

```
GTAGGTGCTAACTTGTGTACAGATCTATTCACATAGCATTTCATCTAAGAACCACACTTTTTTTTTTACACCATCTGAT
ATCATTGTCACCTTTCTTTCAAGATGGCATCCCCAGGGGTCCTTTTACTATCATAAAATGCCTTTTTAAAAACCAA
ACTTATAAACAGTGAGCAAAAACAATCAGAATATACATTAGGTCAAAAATACAGAAGCACTTGGCTTTTATTTTAT
TCATTTTGAATTAAGGGTATGAATATGTAGTAGCATTCTCTGGCCTTTATAAATTGCCTTGTGTGCATACTTCG
CTTGAGTCATATCAAAAGTTAGTAGGCAAACCCATAAATATATACCTACTATGTACCCACACAAATTAATAATTTA
AAAAGTTAGTAGGCAGTATTGGCTTTCGTGGCAACCCACAATGAGTTAATTTCATGCTAAAATGACAAACTTGT
TTAAGGAAGTAATACCTGAGGCTTTGAGACATCTTAACTACCTGGCTTGCAGCTAACCATCAGCCTTTCTGTAAA
TATTTTGTAGGGTCTCCAGGTCTGATGGAACAATGGTCTCAGGGACCTCCTGGACCACAGGTGAGTATTTCTC
CCTCTTTGTCTCTTCTGCACTAGAATGTATATAGTCCCTCAAACCTGGCCATCTCCATTTTCAGTCCAAAAGTTATAC
AGCTAGACAACAGTGGTGACATACGTTGCTATTTATGCTCTCTTCTGTCACCTTTCAGGGTGTCAAGGTGAAAA
GGTGAACAGGGTCCCCCTGGTCTCCAGGCTTCCAGGTAAGTCAACTCAAACATATACTGCTTTGGTCCAG
CCTATTGAGCTGAAATCACCATACCGTACCTCTCTTCTCCACCACAATAACATGATTTTCAGGACTGAAGCAAAGA
AAGGTGCATTTTTTCAAACAACTTTTGTGTAATGCTTAATAACATACAATCGTGCTCATGTTGATATTTGGTAGCC
ACCACCCCAAACCTCAATTATTAGCAAATCTCCTGAACGTAGCCATGGGATTGAGATTTGATTTCTTTTCATTTTA
G
```

Exón 27 (54 pb):  Exón 28 (54 pb): 

Forward 5' AGTATTTGGGCTTTCGTGGG '3

Reverse 5' ATTGTGGTGGAGAAGAGAGG '3

- Posiciones de posible apareamiento entre ambos primer's 18
- Tamaño del amplificado 495

Los *primers* se obtuvieron de la empresa MacroGen®. Se realizó un gradiente de temperaturas para determinar la temperatura de alineación de los *primers*, determinando la

temperatura de alineación TM a 58.4°C; logrando estandarizar las siguientes condiciones utilizadas para la PCR, se muestran en la Tabla 1:

| Reacción de PCR | | Programa de PCR | | |
|-----------------|-------|-------------------|------|--------|
| H2O LR | 11 µl | Desnaturalización | 94°C | 5 min |
| Hot Start MM | 10 µl | Amplificación | 94°C | 30 seg |
| Fw [25pM] | 1 µl | Alineamiento | 55°C | 30 seg |
| Rv [25pM] | 1 µl | Extensión | 72°C | 30 seg |
| ADN [100 ng/µl] | 2 µl | Extensión final | 72°C | 7 min |

TABLA 1: uso de termociclador de Applied Biosystems, GeneAmp® PCR System 9700.

El tamaño de los productos de PCR se confirmó por electroforesis en geles de agarosa al 2% empleando el marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas®.

La genotipificación de la variante polimórfica rs42524 se realizó por secuenciación empleando el kit de BigDye Terminator (Applied Biosistem Versión 3.1), de acuerdo a la siguiente reacción:

| Reacción de Secuenciación | | Programa de PCR | | |
|---------------------------|-------|-------------------|--------|--------|
| H2O LR | 11 µl | Desnaturalización | 94°C | 15 min |
| Buffer terminator | 4 µl | Amplificación | 94°C | 30 seg |
| Fw [10pM] | 1 µl | Alineamiento | 58.4°C | 30 seg |
| Big Dye V3.1 | 1 µl | Extensión | 72°C | 45 seg |
| ADN [100 ng/µl] | 1 µl | Extensión final | 72°C | 5 min |

TABLA 2: uso de Termociclador de Applied Biosystems, GeneAmp® PCR System 9700.

Después de la reacción de secuenciación los productos son purificados empleando las columnas Dye Spin (QIAGEN). Las muestras son secadas en un concentrador de vacío y posteriormente son hidratadas con 14 µlitros de formamida ultrapura. Se desnaturalizaron las muestras y fueron leídas en el secuenciador de ADN ABI PRIMS modelo 3130.

Los electroferogramas resultantes son analizados empleando el programa Secuencial o Sequencing analysis. V5.3. A continuación se muestran electroferogramas para muestras de casos con pacientes con aneurismas (GG, GC y CC)

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES.

Variable Dependiente

1. Aneurisma Cerebral

Variables Independientes.

1. Variante genética rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2

| Variable | Definición Operacional | Definición conceptual | Instrumento de Medición | Tipo | Codificación, unidades de medición. |
|--|---|--|--|-------------------------|-------------------------------------|
| Edad. | Años transcurridos desde el nacimiento hasta el momento de la disección arterial cérvico-cerebral. | Número de años del sujeto. | Historia Clínica | Continua. | Años. |
| Género. | Género del paciente de acuerdo a su historia clínica. | Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres | Historia Clínica | Nominal. Dicotómica. | 1. Hombre 2. Mujer. |
| Lateralidad | Sitio encontrado por imagen del aneurisma | Sitio arterial de afección que pueda ser visible por cualquier estudio de imagen | Historia Clínica y neuroimagen | Nominal. Dicotómica | 1.Derecha 2. Izquierda |
| Polimorfismos rs42524 en el exón 28 del gen COL1A2 | Es la aparición de una población de dos o mas formas determinadas genéticamente (alelos, variantes de secuencias) en frecuencias tales que las mas raras de ellas no podría explicarse por una mutación sola. | Variante génica | Posterior a electroferogramas resultantes son analizados empleando el programa Secuencial o Sequencing analysis. V5.3. | Cualitativa nominal | GG GC CC |

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó usando software estadístico (SPSS 21.0). Se describió cada grupo expresando las medidas de tendencia central junto con medidas de dispersión. Las variables con una distribución normal se evaluaron mediante el método de T-Student y aquellas de distribución no normal con el método de Mann-Whitney. En caso de ser necesario la comparación entre más de dos grupos se usó el método de ANOVA y de Kruskal Wallis respectivamente. También se calcularon las odds ratios (OR) de cada factor de riesgo para cuantificar la magnitud de la asociación. Se realizó un ajuste de equilibrio genético de la muestra por medio del método de Hardy-Weinberg. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio fue sometido y aprobado por el Comité de Investigación y al Comité de Bioética de la Institución otorgándole el No. 78/16. Todos los participantes (casos y controles) firmaron el consentimiento informado y el registro de los pacientes se manejó con estricta confidencialidad, de acuerdo a los principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos de la declaración de Fortaleza, Brasil en 2013. (ver APENDICE 1 y 2)

Consideraciones financieras.

Aporte Financiero: clínica de neurología vascular.

RESULTADOS

Análisis Demográfico

Se logró la inclusión de 97 pacientes del Instituto Nacional de Neurología que presentaban diagnóstico confirmado de aneurisma cerebral, los cuales cumplieron los criterios antes descritos. De estos noventa y siete pacientes se tomó muestra a 73 mujeres y 24 hombres. La distribución de edad fue de 15 a 82 años con una media de edad de 51 años (DE 15). 24 pacientes eran menores de 40 años. 43 pacientes se encontraban entre los 41 y 60 años y 30 pacientes eran mayores de 61 años. De todos ellos se extrajo la información demográfica (Ver FIGURA 3).

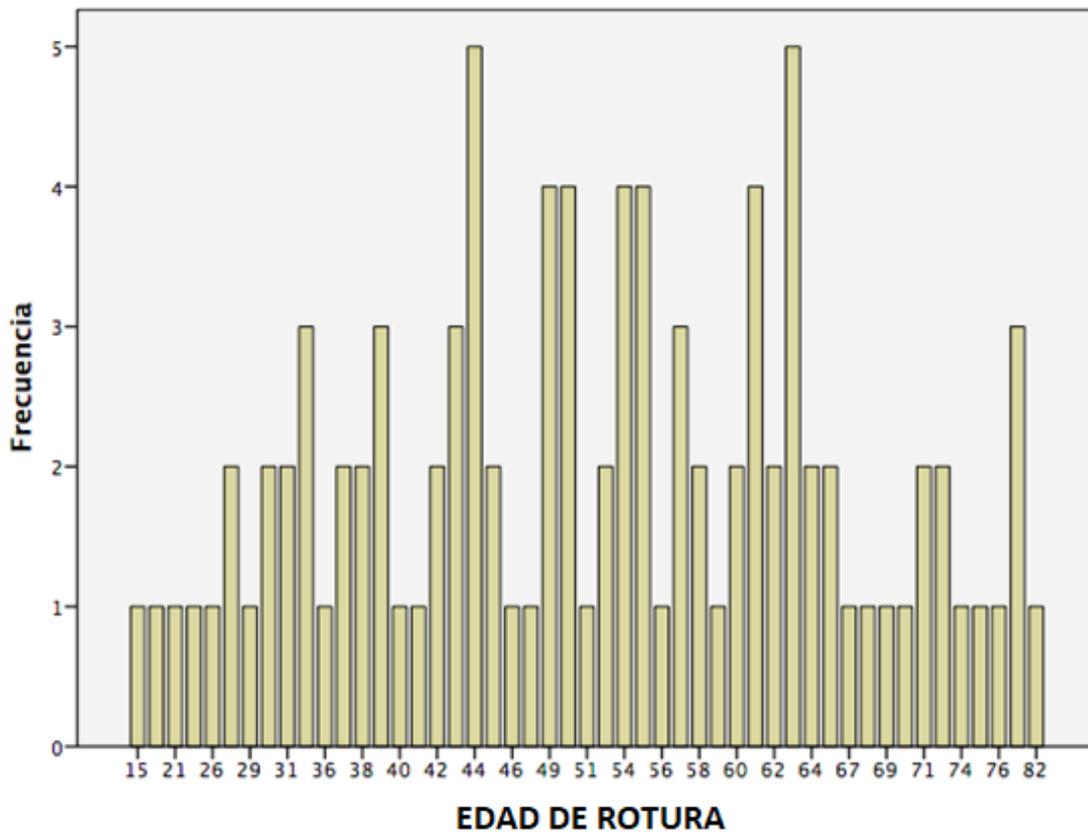


FIGURA 3: Se muestra la frecuencia de edades en los pacientes con aneurismas rotos

El 79.4% (77 pacientes) presentaron un cuadro de hemorragia subaracnoidea por rotura aneurismática y 20.6% (20 pacientes) se catalogaron como aneurismas incidentales. El síntoma pivote o cuadro clínico por el cual se inició su abordaje diagnóstico fue: cefalea en 73 pacientes, 8 pacientes con pérdida del estado de alerta, 4 por crisis convulsivas, hallazgo de imagen en 7 de ellos y disminución súbita de la fuerza en 5 individuos (FIGURA 4). Del total de la muestra 30 pacientes (30.9%) presentaron crisis convulsivas ameritando tratamiento antiepiléptico. En un 27.4% se diagnosticó enfermedad aneurismática múltiple.

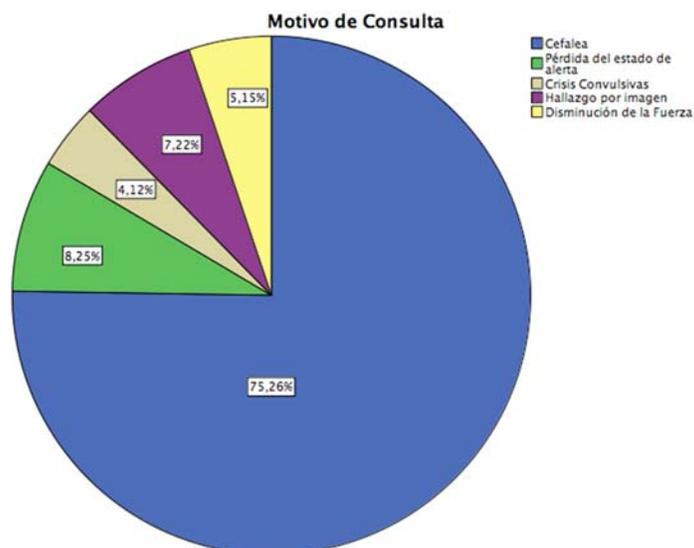


FIGURA 4: Datos clínicos referidos por pacientes o familiares los cuales motivaron el inicio de la atención médica, el cual es considerado como dato pivote para el abordaje diagnóstico, siendo la cefalea *thunderclap* o en estallido el síntoma más referido en un 75.26%.

Los antecedentes más importantes de nuestra población fueron hipertensión arterial sistémica 45.4% (44 pacientes) tabaquismo 37.7% (23 pacientes) y diabetes mellitus en 12.4% de ellos. A su ingreso y egreso los pacientes se catalogaron con una escala de Rankin modificada (MRs, por sus siglas en inglés) como se muestra a continuación (TABLA 3):

| MRs Ingreso | | | MRs Egreso | | |
|--------------|----------------|-------------|--------------|----------------|-------------|
| | Frecuencia (n) | Porcentaje | | Frecuencia (n) | Porcentaje |
| 0 | 13 | 13.4% | 0 | 36 | 37.1% |
| 1 | 46 | 47.4% | 1 | 21 | 21.6% |
| 2 | 9 | 9.3% | 2 | 4 | 4.1% |
| 3 | 11 | 11.3% | 3 | 12 | 12.4% |
| 4 | 8 | 8.2% | 4 | 7 | 7.2% |
| 5 | 10 | 10.3% | 5 | 9 | 9.3% |
| 6 | 0 | NA | 6 | 8 | 8.2% |
| Total | 97 | 100% | Total | 97 | 100% |

TABLA 3: Se describe el estado clínico del paciente a su ingreso y egreso mediante la escala de Rankin modificada (MRs). Se observa que el MRs a su ingreso fue de 1 y 0 al egreso en la mayoría de los pacientes, tomar en cuenta que aquí se toman en cuenta para el cálculo aquellos con aneurismas incidentales. Se reportan ocho pacientes finados, se realizó una correlación con el genotipo, sin encontrarse diferencia significativa.

Así mismo a su ingreso al servicio de urgencias del Instituto Nacional de Neurología aquellos pacientes con aneurismas rotos, posterior a tomografía de cráneo se les catalogó

clínicamente y por imagen según las escalas de Hunt y Hess y Fisher. (FIGURA 5). Las localizaciones más frecuentes de los aneurismas fueron arteria comunicante anterior 21.6%, arteria cerebral media derecha 15.5% y segmento comunicante posterior de la arteria carótida interna izquierda con 11.3%, resto de localizaciones se muestran en la (FIGURA 6).

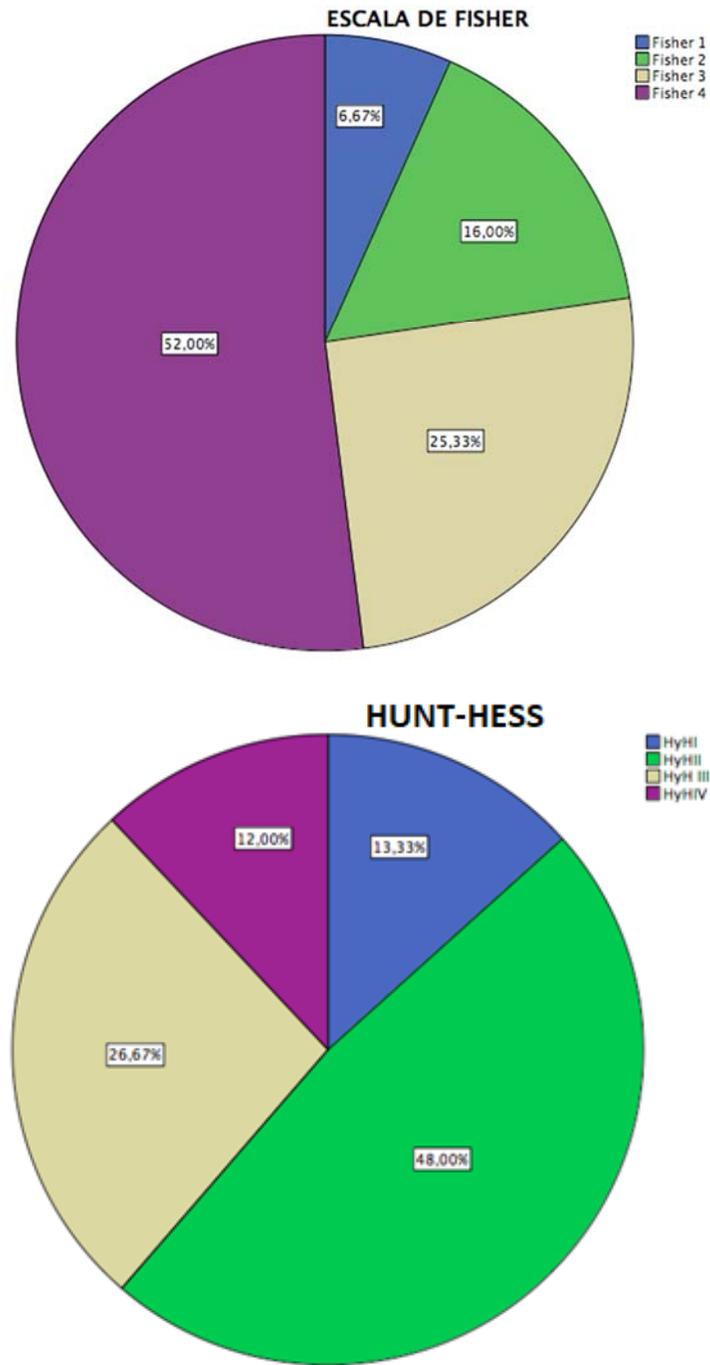


FIGURA 5: *Arriba*: porcentaje de pacientes catalogados según la escala de Fisher. En este cálculo se excluyeron a los pacientes con aneurismas incidentales. Llama la atención la alta incidencia de

casos catalogados como Fisher IV. *Abajo*: porcentaje de pacientes a los cuales según el estado clínico a su ingreso al servicio de urgencias (sólo aneurismas rotos) se les graduó según la escala de Hunt-Hess, observando una alta incidencia en el tipo II.

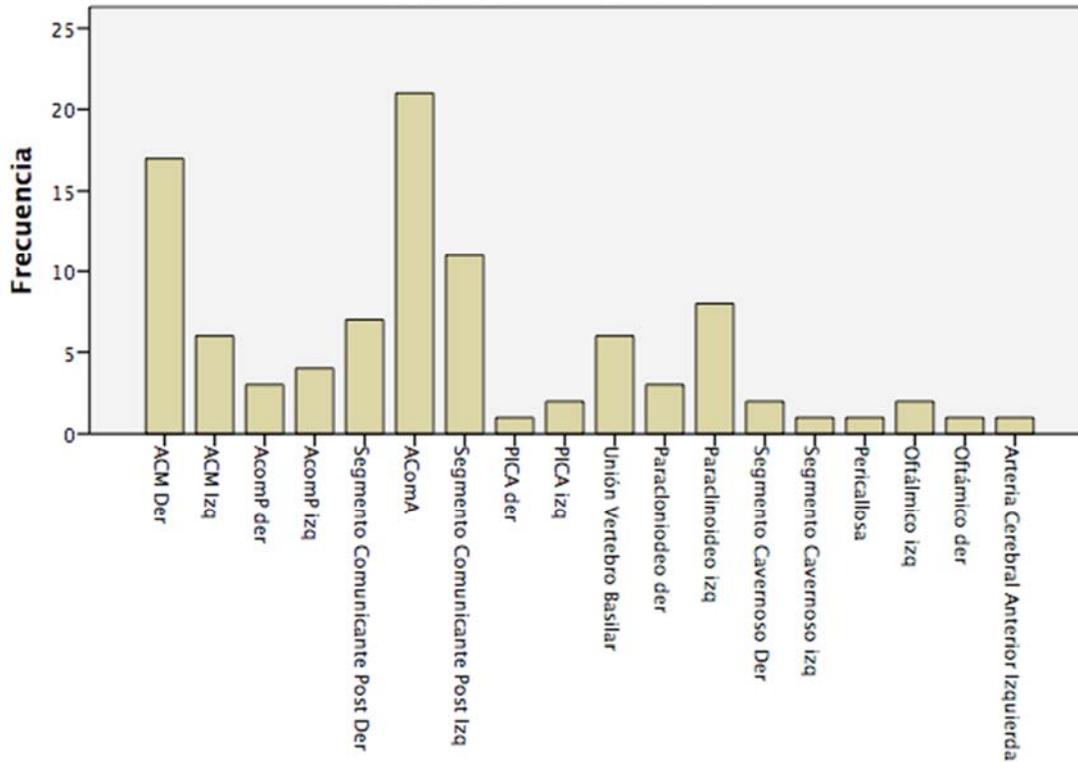


FIGURA 6: Arterias afectadas en nuestra población, en las cuales mediante angiotomografía, angiorrsonancia o Angiografía se reportaron la presencia de aneurismas cerebrales.

Investigación de Genética Molecular

En la (TABLA 4) se muestra la distribución genotípica del polimorfismo rs42524 (exón 28)

| Genotipo | HapMap | Pacientes con AI | Valor de <i>p</i> |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Rs42524 (exón 28) | Frecuencia genotípica, N, (%) | Frecuencia genotípica, N, (%) | |
| GG | 0.719, 46/64 (71.87%) | 0.63, 61/97 (62.88%) | 0.30 |
| GC | 0.250, 16/64 (25%) | 0.31, 30/97 (30.92%) | 0.47 |
| CC | 0.031, 2/64 (3.12%) | 0.06, 6/97 (6.18%) | 0.47 |

pacientes con aneurismas cerebrales. La población estudiada se encontró en equilibrio genético mediante la ecuación de Hardy-Weinberg. Estas frecuencias se compararon con los datos obtenidos de la base de datos HapMap de NCBI.

TABLA 4: Se analizó la asociación entre los grupos y controles mediante la prueba exacta de Fisher para los genotipos GG, GC y CC, encontrando que ninguno es estadísticamente significativo ($p > 0.05$). Abreviaturas: AI, Aneurismas intracraneales.

Se observó que de los 79.4% de los aneurismas rotos 46 casos (75.4%) correspondían al genotipo GG, 25 a GC (32.5%) y 6 a CC (7.8%). Posteriormente se realizó una tabla de contingencia y prueba de chi-cuadrada para aquellos pacientes con genotipo heterocigoto GG para el rs42524 en el exón 28, encontrando un OR 1.76 (IC 95% 0.22 – 1.42). Así mismo se observó que del total de los aneurismas rotos con genotipo heterocigoto GG, el 38.7% correspondían a una HSA Fisher IV siendo éste el más común entre todos p 0.32 con un OR 1.34 (IC 95% 0.55 – 0.99), confiriendo un riesgo de asociación entre el genotipo GG para la variante rs42524 en el exón 28 con aneurismas rotos y la presencia de una HSA con grado Fisher IV.

No se encontró relación con el genotipo del polimorfismo y el desenlace (muerte, Rankin al egreso o complicaciones del procedimiento realizado).

DISCUSIÓN

El desenlace después de una HSA por rotura aneurismática es pobre: 50% de los pacientes muere en el primer mes, 25% sufre alguna discapacidad permanente y el 25% restante tiene riesgo de resangrado. En cambio aquellos que se someten a clipaje de aneurisma no roto la mortalidad y morbilidad disminuye a <2.5% y <6% respectivamente¹³.

La identificación de aquellos pacientes que son mas propensos a padecer un aneurisma intracerebral puede encaminarlos a un tratamiento preventivo y a tener un mejor pronóstico a corto y largo plazo²³, particularmente en la población joven económicamente productiva.

El colágeno tipo I es parte esencial en la conformación de la adventicia, capa mas externa de las arterias cerebrales. Existen diversas variantes genéticas descritas recientemente en distintas poblaciones, que involucran a este gen y otorgan cierto riesgo de desarrollar aneurismas intracerebrales, por sí solas o junto con otros factores de riesgo^{21, 33} mecánicos y de riesgo adquiridos (tabaquismo e hipertensión).

De entre los polimorfismos asociados a aneurismas intracraneales mas reportados en diversas poblaciones (China, Corea, Australia, Japón, Alemania, etc.) está el rs42524 en el exón 28, demostrando diferentes frecuencias alélicas entre pacientes con aneurismas intracraneales y controles, así mismo se ha reportado su asociación^{21, 46} o poca relación con la enfermedad.

En este estudio se demuestra que no existe relación de la variante polimórfica rs42524 en el exón 28 del gen del colágeno tipo 1 alfa 2 en pacientes con aneurismas intracraneales. Se reporta que la variante genotípica GG para la variante rs42524 en el exón 28 es la más común en aneurismas rotos y la presencia de una HSA grado Fisher IV confiriendo un riesgo

de asociación y será la forma clínica de presentación más asociada con este SNP con una p 0.32 y un OR 1.34 (IC 95% 0.55 – 0.99).

Las limitantes de nuestro estudio son el tamaño de muestra y principalmente que las frecuencias genotípicas se compararon con los datos obtenidos de la base de datos HapMap de NCBI, las cuales son de mexicanos/latinos y no tenemos una muestra pareada por edad y género. Además, sería ideal una muestra pareada con controles que presentaran un control angiográfico negativo para aneurismas intracraneales, pero el riesgo beneficio de realizar un estudio contrastado en alguien que no lo amerita no es ético. Existen nuevos estudios donde se ha observado la asociación de esta variante alélica con otro tipo de enfermedades cerebrovasculares, así que se debe de tener cuidado en elegir controles sanos.

Actualmente nos encontramos ampliando la muestra y se decidirá parear los casos de pacientes ya registrados con controles sanos por edad y género que no hayan tenido ningún evento de enfermedad cerebrovascular y si es posible por alguna razón se les haya realizado un estudio de angiotomografía o angiografía cerebral.

El conocer la influencia de estos polimorfismos en nuestra población, nos sirve de guía en la búsqueda de aquellos factores que predisponen a la población a padecer aneurismas cerebrales y prevenir eventos catastróficos como lo es la hemorragia subaracnoidea, la cual merma la productividad y funcionalidad del paciente, incluso llevándolo a la muerte^{3 4}. Las implicaciones clínicas respecto a la consejería genética individual y familiar pueden tener alcances trascendentales en el entorno del paciente y su sociedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gan Q, Qianqian L, Xin H, Chao Y. Collagen Type 1 Alfa 2 (COL1A2) Polymorphism Contributes to Intracranial Aneurysm Susceptibility: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit*, 2017;23:3240-3246. DOI: 10.12659/MSM.902327.
2. Rinkel GJ. Intracranial Aneurysm Screening: Indications and Advice for Practice. *Lancet Neurol*, 2005; 4: 122–28. DOI: 10.1016/S1474-4422(05)00993-2.
3. Ronkainen A, Hernesniemi J, Puranen M et al: Familial Intracranial Aneurysms. *Lancet*, 1997; 349: 380–84. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)80009-8.
4. Cabrera Rayo A, Acal Puga S, Venegas Peña E, et al. Factores pronósticos en pacientes con hemorragia subaracnoidea por ruptura de aneurisma. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int*. 2008; (4):221-225.
5. Bruno A, Carter S, Qualls C, Nolte KB. Incidence of spontaneous subarachnoid hemorrhage among Hispanics and non-Hispanic whites in New Mexico. *Ethn Dis*. 1997;7(1):27-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9253553>. Accessed March 25, 2017

6. Erwin C, José Luis R-S, Luis Manuel M-B, et al. Egresos por enfermedad vascular cerebral aguda en instituciones públicas del sector salud de México: Un análisis de 5.3 millones de hospitalizaciones en 2010. *Rev Mex Neuroci.* 2012;13(5):252-258.
7. Choi JC. Genetics of cerebral small vessel disease. *J stroke.* 2015;17(1):7-16. doi:10.5853/jos.2015.17.1.7.
8. Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C. Genetics of intracranial aneurysms. *Lancet Neurol.* 2005;4(3):179-189. doi:10.1016/S1474-4422(05)01015-X.
9. Schievink WI, Schaid DJ, Michels VV, Piepgras DG: Familial aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a community-based study. *J Neurosurg*, 1995; 83: 426–29. DOI:10.3171/jns.1995.83.3.0426
10. Schievink WI: Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*, 1997; 40: 651–62; discussion 662–63.
11. Gläsker S, Schatlo B, Klingler JH, et al. Associations of collagen type 1A2 polymorphisms with the presence of intracranial aneurysms in patients from Germany. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014;23(2):356-360. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.04.038.
12. Vaicys C, Hunt CD, Heary RF: Ruptured intracranial aneurysm in an adolescent with Alport's syndrome – a new expression of type IV collagenopathy: Case report. *Surg Neurol*, 2000; 54: 68–7
13. Zhu Y, Li W, Ge M, et al. Polymorphism rs42524 of COL1A2 and sporadic intracranial aneurysms in the Chinese population. *J Neurosurg.* 2008;109(6):1060-1064. doi:10.3171/JNS.2008.109.12.1060.
14. Southerland AM, Meschia JF, Worrall BB. Shared associations of nonatherosclerotic, large-vessel, cerebrovascular arteriopathies: considering intracranial aneurysms, cervical artery dissection, moyamoya disease and fibromuscular dysplasia. *Curr Opin Neurol.* 2013;26(1):13-28. doi:10.1097/WCO.0b013e32835c607f.
15. Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, et al. Collagen Type I $\alpha 2$ (COL1A2) Is the Susceptible Gene for Intracranial Aneurysms. *Stroke.* 2004;35(2):443-448. doi:10.1161/01.STR.0000110788.45858.DC.
16. Rodolfo-Castro H, Porcayo-Liborio S. Factores de mal pronóstico en hemorragia subaracnoidea aneurismática en la unidad de terapia intensiva. *Arch Neurocién.* 2005;10(4):221-229.
17. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives. *J Neuroradiol.* 2015;42(2):67-71. doi:10.1016/j.neurad.2015.01.002.
18. Guinto Balanzar G, Guinto Y. Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage: Clinical Outcome. *World Neurosurg.* 2014;81(1):32-33. doi:10.1016/j.wneu.2013.01.050.

19. Bruno A, Carter S, Qualls C, Nolte KB. Incidence of spontaneous subarachnoid hemorrhage among Hispanics and non-Hispanic whites in New Mexico. *Ethn Dis*. 1997;7(1):27-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9253553>. Accessed March 25, 2017
20. Thompson BG, Brown RD, Amin-Hanjani S, et al. Guidelines for the Management of Patients With Unruptured Intracranial Aneurysms: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2015;46(8):2368-2400. doi:10.1161/STR.0000000000000070.
21. Gläsker S, Schatlo B, Klingler JH, et al. Associations of collagen type 1A2 polymorphisms with the presence of intracranial aneurysms in patients from Germany. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(2):356-360. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.04.038.
22. Moran C, Phan TG, Srikanth VK. Cerebral Small Vessel Disease: A Review of Clinical, Radiological, and Histopathological Phenotypes. *Int J Stroke*. 2012;7(1):36-46. doi:10.1111/j.1747-4949.2011.00725.x.
23. Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet*. 2008;40(12):1472-1477. doi:10.1038/ng.240.
24. Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C. Genetics of intracranial aneurysms. *Lancet Neurol*. 2005;4(3):179-189. doi:10.1016/S1474-4422(05)01015-X.
25. Wu P, Li B, Wu A, Wang Y. Is type I alfa 2 collagen gene responsible for intracranial aneurysm in Northeast China? *Neural Regen Res*. 2013;8(5):445-451. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.05.008.
26. Tian D, Wei W, Dong Y. Influence of COL1A2 gene variants on the incidence of hypertensive intracerebral hemorrhage in a Chinese population. *Genet Mol Res*. 2016;15(1):1-7. doi:10.4238/gmr.15017369.
27. Choi JC. Genetics of cerebral small vessel disease. *J stroke*. 2015;17(1):7-16. doi:10.5853/jos.2015.17.1.7.
28. Lindahl K, Rubin CJ, Brändström H, et al. Heterozygosity for a coding SNP in COL1A2 confers a lower BMD and an increased stroke risk. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(4):501-505. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.006.

29. Mohan D, Munteanu V, Coman T, Ciurea A V. Genetic factors involves in intracranial aneurysms--actualities. *J Med Life*. 2015;8(3):336-341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351537>. Accessed April 26, 2016.
30. Pera J, Korostynski M, Krzyszkowski T, et al. Gene expression profiles in human ruptured and unruptured intracranial aneurysms: What is the role of inflammation? *Stroke*. 2010;41(2):224-231. doi:10.1161/STROKEAHA.109.562009.
31. Marchese E, Vignati A, Albanese A, et al. Comparative evaluation of genome-wide gene expression profiles in ruptured and unruptured human intracranial aneurysms. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24(2):185-195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20487632>. Accessed March 25, 2017.
32. Liu W, Pang B, Lu M, et al. The rs42524 COL1A2 polymorphism is associated with primary intracerebral hemorrhage in a Chinese population. *J Clin Neurosci*. 2012;19(12):1711-1714. doi:10.1016/j.jocn.2012.03.025.
33. Jeanne M, Jorgensen J, Gould DB. Molecular and genetic analyses of collagen type IV mutant mouse models of spontaneous intracerebral hemorrhage identify mechanisms for stroke prevention. *Circulation*. 2015;131(18):1555-1565. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013395.
34. Babu RA, Paul P, Purushottam M, Srinivas D, Somanna S, Jain S. Differential expression levels of collagen 1A2, tissue inhibitor of metalloproteinase 4, and cathepsin B in intracranial aneurysms. *Neurol India*. 2016;64(4):663-670. doi:10.4103/0028-3886.185350.
35. Hussain I, Duffis EJ, Gandhi CD, Prestigiacomo CJ. Genome-wide association studies of intracranial aneurysms: An update. *Stroke*. 2013;44(9):2670-2675. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001753.

Apéndice 1.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

Insurgentes Sur 3877

Col. La Fama, C.P. 14269

México, D.F., Tel. 56-06-14-07

www.innn.salud.gob.mx

Identificación de polimorfismos en la cadena alfa 2 del colágeno tipo 1 (Col1 A2) en pacientes mestizo-mexicanos con aneurisma cerebral

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CASOS

1. He sido informado(a) que he sido diagnosticado con un aneurisma cerebral y que en el departamento de enfermedad vascular cerebral y en el departamento de Genética y Biología Molecular se está realizando un estudio para conocer los genes que pueden producir mayor riesgo para desarrollar una aneurisma cerebral.
2. Los genes son las unidades de herencia y contienen el ácido desoxirribonucleico (ADN) que es el material hereditario.
3. En este estudio se investigarán genes que han sido relacionados a un mayor riesgo de presentar un aneurisma cerebral.
4. Estos genes tienen funciones específicas en nuestro organismo, normalmente tienen variantes y algunas de ellas se han asociado a mayor riesgo de tener un aneurisma cerebral cerebral
5. Si aceptó participar en el estudio, los médicos me realizarán algunas preguntas acerca de mi enfermedad, me elaborarán una historia familiar y me tomarán 10 ml de sangre periférica.
6. He sido informado(a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción (para la toma de la sangre).
7. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible sólo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad.
8. He sido informado(a) que mi participación es **VOLUNTARIA** y no tiene costo para mí, ni recibiré remuneración alguna.

9. Si no acepto, esto no afectará de ninguna forma mi atención médica como paciente del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Y tengo libertad de retirar el consentimiento, sin que se afecte el cuidado y tratamiento.
10. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuado.
11. Para cualquier duda o aclaración puedo dirigirme a el departamento de enfermedad vascular cerebral o al departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto o hablar al teléfono 56063822 extensión 4466 con la Dra. Alejandra González Patiño, Dr. Juan José Méndez Gallardo y con el Dr. Antonio Arauz o con el Dr. Ricardo Colín Piana presidente del comité de bioética.
12. Este protocolo sigue los lineamientos de la declaración de Fortaleza, Brasil en 2013.

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN O RESPONSABLE LEGAL

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA.

Nombre del participante y/o responsable legal:

Firma: _____ Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento:

Firma: _____

Apéndice 2



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

Insurgentes Sur 3877
Col. La Fama, C.P. 14269
México, D.F., Tel. 56-06-14-07

www.innn.salud.gob.mx

Identificación de polimorfismos en la cadena alfa 2 del colágeno tipo 1 (Col1 A2) en pacientes mestizo-mexicanos con aneurisma cerebral

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROLES

1. He sido informado(a) que el departamento de enfermedad vascular y el departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este instituto están realizando un estudio para determinar las variaciones de genes en personas de la población mexicana.
2. Los genes son las unidades de herencia y contienen el ácido desoxirribonucleico (ADN) que es el material hereditario.
3. En este estudio se investigarán genes que han sido relacionados a un mayor riesgo de presentar un aneurisma cerebral.
4. Estos genes tienen funciones específicas en nuestro organismo, normalmente tienen variantes y algunas de ellas se han asociado a mayor riesgo de tener un aneurisma cerebral.
5. Si aceptó participar en el estudio, los médicos me realizarán una historia familiar y me tomarán 10 ml de sangre periférica.
6. He sido informado(a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción (para la toma de la sangre).
7. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible sólo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad.
8. He sido informado(a) que mi participación es **VOLUNTARIA** y no tiene costo para mí, ni recibiré remuneración alguna.

9. Si no acepto, esto no afectará de ninguna forma mi atención médica como paciente del InsINNN o INNyCM.
10. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuado.
13. Para cualquier duda o aclaración puedo dirigirme al departamento de enfermedad vascular cerebral o al departamento de Neurogenética y Biología molecular de este instituto o hablar al teléfono 56063822 extensión 4466 con la Dra. Alejandra González Patiño, Dr. Juan José Méndez Gallardo y con el Dr. Antonio Arauz o con el Dr. Ricardo Colín Piana presidente del comité de bioética.
11. Este protocolo sigue los lineamientos de la declaración de Fortaleza, Brasil en 2013.

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN O RESPONSABLE LEGAL

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA.

Nombre del participante y/o responsable legal:

Firma: _____ Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento:

Firma: _____