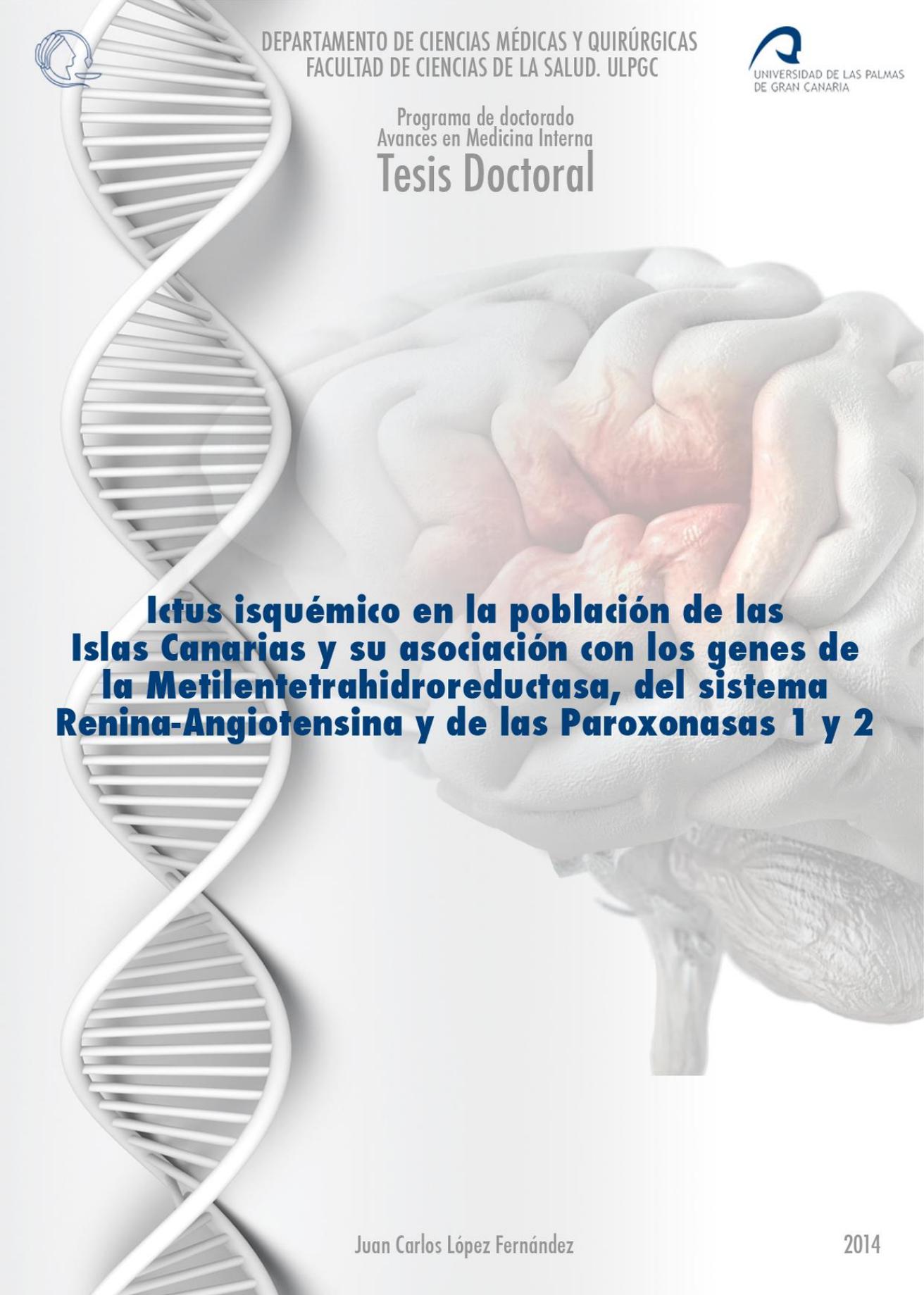




DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. ULPGC



Programa de doctorado
Avances en Medicina Interna
Tesis Doctoral



**Ictus isquémico en la población de las
Islas Canarias y su asociación con los genes de
la Metilentetrahidroreductasa, del sistema
Renina-Angiotensina y de las Paroxonasas 1 y 2**

Juan Carlos López Fernández

2014



Anexo I

**D. ESTEBAN PÉREZ ALONSO, SECRETARIO DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS DE
LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el Consejo Ordinario de Departamento de Doctores en su sesión de fecha 29 de julio de 2014, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Estudio de la asociación de eventos cerebrovasculares y variantes genéticas: Genes del Sistema Renina-Angiotensina, Paroxonasa y Metilentetrahidroreductasa", presentada por el/la doctorando/a, Don/Doña: Juan Carlos López Fernández y dirigida por los doctores, Don Pedro Betancor León, Don Francisco Rodríguez Esparragón, Don José Carlos Rodríguez Pérez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veintinueve de julio de dos mil catorce.



ANEXO II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Facultad Ciencias de la Salud, Departamento Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Programa de doctorado “Avances en Medicina Interna”

TÍTULO DE LA TESIS

**ICTUS ISQUÉMICO EN LA POBLACIÓN DE LAS ISLAS CANARIAS Y SU
ASOCIACIÓN CON LOS GENES DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO
REDUCTASA, DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y DE LAS
PAROXONASAS 1 Y 2**

Tesis Doctoral presentada por D/D^a Juan Carlos López Fernández

Dirigida por el Dr. D. Pedro Betancor León

Dirigida por el Dr. D. Francisco Rodríguez Esparragón

Dirigida por el Dr. D. José Carlos Rodríguez Pérez

El Director,

El Director,

El Director,

El Doctorando

(Firma)

(Firma)

(Firma)

(Firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 30 de Septiembre de 2014

Agradecimientos

Deseo agradecer el trabajo a todos aquellos que han contribuido a llevar a cabo esta tesis, sin cuyo esfuerzo no se hubiese podido conseguir. En primer lugar a los tres directores de la misma, los doctores D. Pedro Betancor León, D. José Carlos Rodríguez Pérez, y especialmente al Dr. D. Francisco Rodríguez Esparragón que ha tenido una enorme implicación en el proyecto. Ellos me han brindado su amistad, su consejo y su apoyo incondicional, además de haber aportado un gran esfuerzo personal por conseguir este objetivo.

Es justo reconocer además el trabajo del personal de la Unidad de Investigación en el procesado y genotipado de las muestras, en especial a la Dra. Nisa Buset Ríos y a Arancha Anabitarte. También ha sido indispensable el trabajo de Miguel Ángel García Bello por su inestimable ayuda para realizar el análisis estadístico. Además deseo reseñar otro reconocimiento a la Dra. Fiuza Pérez, con la que me une una amistad de muchos años, cuyo ánimo y orientación han resultado ser un impulso determinante.

También deseo agradecer a los pacientes que participaron desinteresadamente en el estudio y a todo el personal del Servicio y la planta de Neurología, especialmente la ayuda de la supervisora Amparo Balea que no solo hace habitualmente un gran esfuerzo en la coordinación del trabajo de nuestra planta de hospitalización, sino que además fue una figura indispensable para este trabajo.

No puedo dejar pasar tampoco mi reconocimiento a “Verona” (Juan Ramírez Verona), un referente imprescindible en la ilustración de los trabajos científicos en nuestro hospital. Desde principio de los 90 contamos con su

valiosa ayuda para elaborar cualquier comunicación científica, y son incontables los ejemplos en los que su esfuerzo y creatividad le ha añadido un valor estético y de calidad a nuestros trabajos.

Un último reconocimiento a la dirección de nuestro hospital por el apoyo que presta a las iniciativas científicas y que siempre hace gala de un talante constructivo y cooperativo.

En el terreno personal deseo dedicar y agradecer este trabajo tanto a mis amigos, como a mis padres, a mis hijas Laura y Julia que han vivido este proyecto con entusiasmo a pesar de la distancia, y a Anabel que ha sido un apoyo incondicional en todo momento.

Índice de contenidos

Índice

1. Introducción	1
1. Definición del ictus, epidemiología y repercusiones	1
2. Clasificación del ictus: Topográfica y etiológica	3
2. Factores de riesgo asociados al ictus	7
1. Factores de riesgo no modificables	9
i. Edad	9
ii. Sexo	9
iii. Raza	9
iv. Herencia	10
2. Factores de riesgo modificables	11
i. Alcohol	11
ii. Tabaco	12
iii. Drogas	13
iv. Anticonceptivos y terapia hormonal	13
v. Sedentarismo	13
vi. Dieta	15
vii. Obesidad	16
viii. Diabetes Mellitus	16
ix. Dislipemia	17
x. Hipertensión arterial	19
xi. Síndrome metabólico	20
xii. Cardiopatías embolígenas	21
xiii. Migraña	22
xiv. Síndrome Apneas-Hipopnea	22

xv. Síndrome antifosfolípido	23
xvi. Hiperhomocisteinemia	24
xvii. Procesos inflamatorios crónicos	25
3. Actualización de la Genética en el Ictus	25
1. Métodos diagnósticos	28
2. Polimorfismos e Ictus en estudios de asociación y GWAS	32
i. Sistema Renina-Angiotensina	32
ii. Óxido Nítrico sintetasa	33
iii. Paraxonosasas	33
iv. Loci PHACTR1	36
v. Locus 9p21	37
vi. Polimorfismo KIV2	39
vii. Polimorfismo PRKCH	39
viii. Variantes genéticas gen Transtiretina	40
ix. Polimorfismos vinculados a la inflamación	41
x. Polimorfismos BRCA-1	41
xi. Sistema de coagulación y fibrinólisis	42
xii. Migraña	43
xiii. Enfermedades monogénicas	44
3. Ictus hemorrágicos	45
4. Trombosis de senos	46
5. Aneurismas	47
6. Farmacogenómica	47
4. Justificación del trabajo	51
5. Objetivos	52

6. Material y métodos	53
1. Reclutamiento poblacional	54
2. Extracción del DNA	56
3. Determinación de las variantes	57
4. Análisis de datos	60
7. Resultados	63
1. Descriptiva de la población (casos y controles)	64
1.1.- Muestra	65
1.2.- Casos	65
1.3.- Estratificación por edad y sexo con controles de la base de datos poblacional “Estudio PROCAGENE”	65
1.4.- Comparación casos y controles: Prueba T	67
1.5.- Comparación casos y controles: Prueba χ^2	68
2. Frecuencias alélicas y genotípicas (casos y controles) (R):	72
2.1.-MTHFR (C677T)	73
2.2.-PON1 (Met55Leu)	73
2.3.-PON1 (Gln192Arg)	74
2.4.-PON2 (Cys311Ser)	75
2.5.-AT1R (A1166C)	76
3. Equilibrio Hardy-Wienberg (total de la población analizada)	76

2.1.-MTHFR (C677T)	77
2.2.-PON1 (Met55Leu)	77
2.3.-PON1 (Gln192Arg)	77
2.4.-PON2 (Cys311Ser)	78
2.5.-AT1R (A1166C)	78
4.- Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante	78
4.1.-Variante C667T	79
4.2.-Alelo C ₆₇₇ y riesgo	79
4.3.-Alelo T ₆₇₇ y riesgo	80
5. Variante C677T por sexos	81
5.1.-Genotipos C77T en hombres	81
5.2.-Genotipos C677T en mujeres	81
5.3.- Variante C677T: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles	82
5.4.- Variante C677T: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)	85
6. Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante	92
6.1.- Variante PON1 (Met55Leu)	92
6.2.- Alelo Met55 y riesgo	93

6.3.- Alelo Leu55 y riesgo	94
6.4.- Variante Met55Leu por sexos	95
6.5.- Genotipos Met55Leu en hombres	95
6.6.- Genotipos Met55Leu en mujeres	96
6.7.- Variante Met55Leu: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles	97
6.8.- Variante Met55Leu: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)	99
7. Tablas de contingencia y riesgo: análisis univariante	99
7.1.- Variante PON1 (Gln192Arg)	99
7.2.- Alelo Gln192 (alelo Q) y riesgo	100
7.3.- Alelo Arg192 (alelo R) y riesgo	101
7.4.- Variante PON1 (Gln192Arg) por sexos	102
7.5.- Genotipos Gln192Arg en hombres	102
7.6.- Genotipos Gln192Arg en mujeres	103
7.7.- Variante Gln192Arg: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles	103
7.8.- Variante Gln192Arg: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)	104
7.9.- Haplotipos Paraoxonasa 1: Inferencia y contraste	104

8. Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante	107
8.1.- Variante PON2 (Cys311Ser)	107
8.2.- Alelo Cys311 y riesgo	108
8.3.- Alelo Ser311 y riesgo	109
8.4.- Variante PON2 (Cys311Ser) por sexos	110
8.5.- Genotipos Cys311Ser en hombres	110
8.6.- Genotipos Cys311Ser en mujeres	112
8.7.- Variante Cys311Ser: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles	113
8.8.- Variante Cys311Ser: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)	114
9. Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante	114
9.1.- Variante AT1R (A1166C)	115
9.2.- Alelo 1166C y riesgo	116
9.3.- Alelo A1166 y riesgo	117
9.4.- Variante AT1R (A1166C) por sexos	117
9.5.- Genotipos A1166C en hombres	117
9.6.- Genotipos A166C en mujeres	118
9.7.- Variante A1166C: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles	118

9.8.- Variante A166C: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)	119
10. Análisis de regresión logística binaria multivariante	119
11. Discusión	124
12. Limitaciones y aplicación del estudio	146
13. Conclusiones	149
14. Anexos	151
a. Definiciones	152
b. Glosario de abreviaturas	155
c. Consentimiento informado	162
15. Bibliografía	165

Introducción

El término ictus, ataque cerebral, o golpe en latín, representa a una entidad de causa vascular, con una presentación brusca o violenta que conduce a la necrosis tisular, y así afecta a la funcionalidad del encéfalo, y que puede presentar manifestaciones clínicas variables en función del territorio arterial afectado (1, 2). A lo largo de la historia este proceso clínico-patológico se ha conocido bajo diversas denominaciones, por ejemplo apoplejía, término de implicaciones históricas, asociado a una connotación de mal pronóstico y de imposibilidad de recuperación. El ictus se debe considerar un síndrome y no una entidad única, ya que es una patología heterogénea que agrupa por un lado a la patología isquémica y por otro a la hemorrágica, y que puede afectar tanto a la patología de vaso pequeño como a gran vaso, teniendo además la posibilidad de estar relacionado con múltiples etiologías (3).

El ictus constituye un problema clínico de primer orden y representa la segunda causa de muerte en todo el mundo (4-6). No obstante asistimos a una disminución de la mortalidad en países desarrollados (7-9). Este descenso en la mortalidad tendrá un impacto limitado en la carga que representa el ictus, dado el envejecimiento de la población que conlleva una mayor incidencia del mismo. De esta manera el descenso de la mortalidad por si mismo no va a ser suficiente para disminuir las repercusiones sociales y personales (10, 11) Se estima que 1 de cada 5 mujeres y 1 de cada 6 hombres sufrirán un ictus a lo largo de su vida (12). La incidencia del ictus presenta variaciones geográficas tanto en nuestro país como en el resto de Europa (6, 13, 14). La tasa de mortalidad en Cataluña en relación con ictus fue de 92 en hombres y 119 en mujeres por cada 100.000 habitantes mayores de 24 años; las tasas ajustadas por edad fueron de 58 (IC [intervalo de confianza] 95%: 56 a 61) y 43 (IC 95%:

41 a 44), respectivamente (15); la incidencia acumulada (casos mortales y no mortales) fue de 218 (IC 95%: 214 a 221) en hombres y de 127 (IC 95%: 125 a 128) en mujeres por 100.000 habitantes (15, 16). Otros estudios han arrojado una incidencia menor con 150 nuevos casos por 100.000 habitantes (17). A este respecto debemos señalar que los estudios epidemiológicos sobre el ictus están lastrados por problemas metodológicos dado que en la mayoría de ellos la información disponible se basa en registros hospitalarios, en encuestas realizadas puerta a puerta, en población total por muestreo o mediante el registro de las defunciones. Con respecto a la prevalencia, los datos disponibles en nuestro país la sitúan en torno al 2% en mayores de 20 años en el área de Alcoy (18). Las cifras serían más altas cuando se restringe la población estudiada a los subgrupos de mayor edad, alcanzando un 16,8 % en el área de Madrid (19). Un metanálisis de diversos estudios realizados en mayores de 70 años y en distintas zonas geográficas halló que las tasas de prevalencia ajustadas por edad fueron el 7,3% para los varones, 5,6% para las mujeres, y el 6,4% para ambos sexos (20).

Entre las posibles consecuencias del ictus está la discapacidad que llega a alcanzar en algunas series una tasa del 7 % (21), entre las causas de discapacidad relacionadas con el ictus podemos encontrar los déficits motores o los del lenguaje, alteraciones psíquicas, crisis epilépticas secundarias o el deterioro cognitivo (22). Debemos señalar además, que la enfermedad vascular es la segunda causa de demencia y se relaciona no solo con la demencia vascular, sino que también tiene una acción sinérgica sobre la enfermedad de Alzheimer, ya que favorece su aparición precoz (23).

A la vista de los datos citados vemos que los costes atribuibles al ictus, ya sea personales, familiares o sociales son enormes (24, 25), siendo miles las personas afectadas en nuestro país, así como millones las horas empleadas en el cuidado tanto por la familia como personal sanitario (26). En la estimación de los costes debemos considerar tanto los costes indirectos, como los ligados a la pérdida de la capacidad productiva, que dependerán de la edad y de la profesión del sujeto afectado (27). Además cada una de las intervenciones diagnósticas y terapéuticas que se practican en el ictus supone un coste y con frecuencia se plantea la relación coste-efectividad de las mismas (26, 28).

Clasificación

Los ictus se clasifican en diversos subtipos siguiendo criterios clínicos, topográficos, patogénicos, diagnósticos y pronósticos (2, 29). Después de dos ediciones previas, en 1990 el “*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*” (NINDS) de Estados Unidos trató de definir las variadas formas de ictus según su presentación clínica, sus mecanismos patogénicos y sus lesiones anatomopatológicas (29). En líneas generales los ictus pueden dividirse en dos grandes grupos según su mecanismo de producción: la isquemia cerebral o ictus isquémico (IS) y la hemorragia intracraneal o ictus hemorrágico (IH) (10, 30). Los IS representan entre el 80 y el 85 % de todos los ictus, mientras que el 15-20% restante obedecen a un IH (30). A su vez, dentro de la isquemia cerebral se puede distinguir entre la isquemia cerebral focal, que afecta a una sola zona del encéfalo, y la isquemia cerebral global, que afecta al encéfalo de forma difusa. Por otra parte, dentro de los IH se diferencian los hematomas cerebrales, ya sean profundos o corticales, además de la hemorragia subaracnoidea (HSA) (10).

Según la duración del proceso isquémico, clásicamente se consideran dos tipos de isquemia cerebral focal: el Ataque Isquémico Transitorio (AIT) y el infarto cerebral (2). El AIT se define como un episodio de isquemia cerebral focal o monocular de duración inferior a 24 horas, mientras que el infarto cerebral produce un déficit neurológico que persiste más de 24 horas, indicando la presencia de necrosis tisular (2), aunque se han planteado diversas objeciones a la definición de AIT en estos términos. La duración de 24 horas se considera arbitraria, de hecho, la mayoría de los AIT duran menos una hora (típicamente menos de 10 minutos). Hoy en día se postula que las medidas terapéuticas para la isquemia cerebral se deberían poner en marcha en las primeras horas y, por tanto, el intervalo de 24 horas para definir los AIT puede resultar excesivo. Además una proporción importante de estos episodios transitorios se asocian a lesiones cerebrales que aparecen como establecidas en los estudios de neuroimagen, especialmente cuando empleamos la Resonancia Magnética Craneal (RMN) para el diagnóstico (31). Por otra parte, el diagnóstico de AIT puede dar una falsa impresión de benignidad, cuando en realidad los pacientes que han sufrido un AIT tienen un riesgo alto de sufrir un ictus y de aparición de otros eventos vasculares, lo que obliga a adoptar medidas de prevención secundaria globales (32).

Según la causa subyacente se distinguen varias categorías clínicas de IS (33), en primer lugar tenemos la enfermedad ateromatosa de gran vaso que puede afectar a las arterias carótidas o vertebrales de localización extracraneal, enfermedad que también puede asentar en las principales arterias intracraneales (34, 35). Las placas pueden ser estables y condicionar un evento clínico por una estenosis o que actúe por un mecanismo hemodinámico,

o producir la clínica a nivel distal por un embolismo arteria-arteria en relación con la presencia de una placa heterogénea e inestable. Los ictus cardioembólicos se relacionan con una fuente cardíaca de émbolos ya sea en presencia o no de patología estructural, siendo el ejemplo fundamental la fibrilación auricular (FA), ya sea valvular (FAV) o no valvular (FANV); aunque el ictus embólico puede relacionarse con muchas otras patologías cardíacas, como una válvula protésica, endocarditis, trombos murales secundarios a etiología isquémica entre muchas otras causas (10). Los ictus de origen ateromatoso al igual que los de causa cardioembólica se suelen expresar como síndromes territoriales presentando clínica cortical como la afasia, las agnosias y los déficits campimétricos. Otra de las alternativas etiológicas fundamentales es la patología lacunar o de pequeño vaso que afecta a arterias perforantes y que tiene como sustrato la lipohialinosis y la microateromatosis, y que se relaciona desde el punto de vista etiológico con la hipertensión o la diabetes, y desde el punto de vista clínico con la presentación en forma de síndromes lacunares. El resto de las etiologías comprende un conjunto de entidades menos frecuentes entre las que podemos encontrar disecciones, vasculitis, síndrome antifosfolípido (SAF), causas genéticas y muchas otras (10). El estudio etiológico a veces es difícil y requiere un esfuerzo diagnóstico a pesar del cual nos encontramos en torno a un 25-40% de ictus que se consideran de causa indeterminada (36). Los ictus también se pueden clasificar desde el punto de vista topográfico en función del vaso afectado, lo que lleva aparejada una variabilidad clínica en función del lecho arterial lesionado (37). Tenemos en primer lugar los ictus territoriales que pueden afectar a la totalidad del territorio anterior o de manera parcial, clasificándose conforme a la clasificación

"*Oxfordshire Stroke Project Classification*" (OCSP) en 4 categorías. Estas serían en primer lugar los síndromes territoriales tipo "*Total anterior circulation infarct* (TACI)" o "*Partial anterior circulation infarct* (TACI)"; además estarían los infartos lacunares que se denominan "*Lacunar anterior circulation infarct*" (LACI) y los ictus de circulación posterior o "*Posterior circulation infarct*" (POCI) (38).

La isquemia cerebral global tiene su origen en un descenso del flujo sanguíneo de todo el encéfalo, como ocurre con la parada cardíaca. Afecta a los hemisferios cerebrales de forma difusa, con o sin lesión asociada del tronco del encéfalo y/o cerebelo. Clínicamente puede provocar síndromes cerebrales focales que se localizan de manera característica en los territorios frontera entre las áreas irrigadas por la cerebral anterior y la media y la que limita entre los territorios irrigados por las arterias cerebrales media y posterior; también puede presentarse como déficits cognitivos como puede ser un trastorno de memoria, un estado vegetativo persistente o la muerte cerebral.

Los IH, hematomas o hemorragias cerebrales son extravasaciones de sangre hacia el parénquima cerebral. La etiología más frecuente de los mismos es la hipertensión arterial, que se asocia hemorragias subcorticales. Otras causas de IH incluyen la angiopatía amiloide que es más propia de ancianos, cuya topografía es cortical denominándose hematomas lobares, además están las malformaciones vasculares, fármacos (p. ej. anticoagulantes), tóxicos (p. ej. alcohol, cocaína), diátesis hemorrágicas y tumores. Según la topografía, podemos clasificar la hemorragia parenquimatosa en: lobar, profunda (ganglios basales, capsular o subtalámica), troncoencefálica y cerebelosa. La presentación clínica depende de la localización y el volumen del sangrado. Los

signos y síntomas de una hemorragia cerebral pueden ser indistinguibles de los de los IS, aunque en la hemorragia cerebral son más frecuentes la disminución de la conciencia y la cefalea intensa. El diagnóstico requiere la realización de una Tomografía computarizada craneal (TAC). La hemorragia subaracnoidea (HSA) primaria que consiste en la extravasación primaria de sangre al espacio subaracnoideo que se debe generalmente a la rotura de un aneurisma y que típicamente provoca una cefalea brusca e intensa, con frecuencia asociada a signos meníngeos y alteración del nivel de conciencia.

Factores de riesgo

El IS es una de las manifestaciones de la enfermedad vascular, como también lo son la enfermedad de arterias coronarias o cardiopatía isquémica (EAC) o la enfermedad arterial periférica (EAP). Estas enfermedades comparten factores de riesgo (FR) y mecanismos patogénicos, y además ocurre que con frecuencia estas enfermedades se solapan (39, 40). La mayor parte de los ictus, tanto isquémicos como hemorrágicos, se relacionan con un grupo reducido de 10 factores de riesgo (41). No obstante los FR conocidos no explican la totalidad del riesgo relacionado con esta enfermedad, aunque las estimaciones son variables se especula que este riesgo no explicado puede alcanzar el 50 % (42). Se han encontrado vínculos epidemiológicos entre los ictus y múltiples FR, algunos de los FR están bien documentados, mientras que otros aún deben ser confirmados. Los FR pueden clasificarse como modificables, potencialmente modificables y no modificables. Tenemos además que la adición de FR incrementa el riesgo de sufrir un ictus. Es importante detectar pacientes con FR no modificables ya que, aunque éstos no se puedan tratar, identifican sujetos de alto riesgo en los que la coexistencia de FR

modificables sugiera la necesidad de realizar un control preventivo más estricto. En la tabla se recoge una clasificación de los factores de riesgo tanto para los IS como para los hemorrágicos (IH) (43).

Tabla Factores de riesgo de los ictus isquémicos

- I) Factores de riesgo bien documentados
 - a) Modificables
 - Hipertensión arterial
 - Cardiopatía
 - Fibrilación auricular
 - Endocarditis Infecciosa
 - Estenosis mitral
 - Infarto de miocardio reciente.
 - Tabaquismo
 - Anemia de células falciformes
 - AITs previos
 - Estenosis carotídea asintomática
 - b) Potencialmente modificables
 - Diabetes mellitus
 - Homocisteinemia
 - Hipertrofia ventricular
 - c) No modificables
 - Edad
 - Sexo
 - Factores hereditarios
 - Raza/etnia
 - Localización geográfica
- II) Factores de riesgo menos documentados
 - a) Potencialmente modificables
 - Dislipemias
 - Otras cardiopatías
 - Miocardopatía
 - Discinesia de la pared ventricular
 - Endocarditis no bacteriana
 - Calcificación del anillo mitral
 - Prolapso mitral
 - Contraste ecocardiográfico espontáneo
 - Estenosis aórtica
 - Foramen oval permanente
 - Aneurisma del septo atrial
 - Uso de anticonceptivos orales
 - Consumo excesivo de alcohol
 - Consumo de drogas
 - Sedentarismo
 - Obesidad
 - Factores dietéticos
 - Hematocrito elevado
 - Hiperinsulinemia/ resistencia a la insulina
 - Desencadenantes agudos: estrés
 - Migraña
 - Estados de hipercoagulabilidad e inflamación
 - Enfermedad subclínica
 - Engrosamiento íntima-media
 - Ateromatosis aórtica
 - Factores socioeconómicos
 - b) No modificables
 - Estación del año
 - Clima

Fuente: Sacco et al (43)

Factores de riesgo no modificables

La edad es el principal FR no modificable para el ictus, de manera que la incidencia de ictus se duplica aproximadamente cada 10 años a partir de los 55 años, aunque las cifras varían considerablemente, incluso dentro de una misma región (44, 45). A partir de los 75 años, las tasas específicas de mortalidad vascular referidas al ictus por grupo de edad (década) se sitúan en la primera causa de muerte (46, 47).

El sexo es otro FR ya que el ictus es más prevalente en hombres que en mujeres, salvo por encima de los 85 años y entre los 35 y 45 años (45, 47). Las muertes por enfermedad vascular en España son más numerosas en mujeres que en hombres, aunque la tasa ajustada por edad y tipo de enfermedad vascular es superior en los hombres (48, 49).

La raza constituye otro de los FR no modificable pues en diversos estudios se ha visto que las personas de origen afroamericano e hispanoamericano presentan una mayor incidencia y mortalidad por ictus (47, 50), hallazgo significativo para el IH (51). Una explicación de este hecho puede ser la mayor prevalencia de factores de riesgo como la hipertensión o la diabetes entre la población negra afroamericana, aunque es improbable que estos factores puedan explicar el exceso de carga en ciertas razas. En nuestro entorno no hemos hallado diferencias significativas en relación con la prevalencia de los principales factores de riesgo entre la población española con ictus respecto la del norte de Europa, salvo en lo relativo a la hipertensión, que fue más prevalente en población española (52). Por otra parte se han visto

diferencias raciales en lo relación con la respuesta a los fármacos antiagregantes y a hipotensores (53, 54).

La historia familiar de ictus confiere un mayor riesgo de padecer un ictus, este hecho se ha vinculado en parte con una mayor susceptibilidad a padecer estos factores, y en parte con el compartir un mismo estilo de vida (55, 56). La historia familiar ha mostrado un mayor riesgo para los gemelos homocigotos respecto a los heterocigotos en una revisión sistemática de estudios observacionales, este riesgo afecta tanto a la microangiopatía como a la patología de vaso grande (57). Los estudios en gemelos apoyan el papel de la herencia en la patogenia del ictus, no obstante el número de casos es pequeño y el intervalo de confianza amplio (58, 59). Se plantea obtener más información por el estudio de historias familiares de casos índice, aunque es susceptible de sesgos (57, 60).

Se estima que la herencia participa en la patogenia del ictus en un 37,5 % de los casos de IS, distribuyéndose por subtipos etiológicos en un 40.3% para la enfermedad de gran vaso, 32.6% para el cardioembólico y para la enfermedad de pequeño vaso el 16.1% (61). El riesgo diferencial de la aterosclerosis en la población general puede reflejar variaciones en los genes que modulan la respuesta inflamatoria a los lípidos oxidados en la pared arterial (62). Por ello se ha sugerido un papel diferencial de los genes que participan en la patogenia de la aterosclerosis (63, 64). La historia familiar de patología vascular ocurre con más frecuencia en mujeres que en hombres (65).

El riesgo aumentado de padecer un ictus se puede relacionar con diversos mecanismos como la transmisión hereditaria de los factores de riesgo

de ictus, la herencia de una susceptibilidad a los efectos de los factores de riesgo, o por compartir en el entorno familiar factores culturales, ambientales o de estilo de vida, y a la interacción entre factores ambientales y genéticos (66-68). Ejemplo de estas interacciones son la hipertensión y la diabetes, además de otros FR como puede ser la hiperhomocisteinemia (69). Dado que el ictus y la EAC comparten muchos factores de riesgo y patogenia se han hecho intentos de vincular al ictus con los polimorfismos asociados al Infarto agudo de miocardio (IAM) y a la EAC, pero no se ha encontrado significación estadística a la hora de establecer la relación de la misma magnitud en lo referente al ictus (70). No obstante un metanálisis posterior sí demostró solapamiento entre los fenotipos de enfermedad EAC e IS, especialmente para la enfermedad de gran vaso (71).

Factores de riesgo modificables

Los FR modificables son aquellos que se benefician de una intervención terapéutica a la hora de reducir la posibilidad de sufrir un evento vascular. Entre ellos tenemos el consumo de alcohol, tabaquismo, sedentarismo, la dislipemia y especialmente la hipertensión, entre otros.

El consumo de alcohol ha mostrado relación con el riesgo vascular y que esta relación ocurre en forma de “J” para el riesgo de morbimortalidad de la EAC y la cerebrovascular. De esta manera los consumos pequeños podrían tener un efecto protector frente a un efecto perjudicial que ocurre con el consumo de cantidades mayores del mismo (72-74). El mecanismo por el que un consumo moderado de alcohol se ha relacionado con la reducción de la probabilidad de experimentar un IS puede estar relacionado con un aumento en

las cifras de HDL (75), con una disminución de la agregación plaquetaria (76), y una menor concentración de fibrinógeno (77). El riesgo asociado con el alcohol se eleva a consecuencia de varios mecanismos, entre ellos están la hipertensión secundaria a su consumo, un aumento de la coagulabilidad, la reducción del flujo sanguíneo cerebral o relacionado con fenómenos embólicos de origen cardíaco (78-80). Además el consumo de alcohol se ha relacionado con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (81). Además tenemos que la relación entre el de alcohol y el IH se ha demostrado que es lineal (82).

El tabaco es otro potente FR para experimentar un ictus tras ajustar otros con otros factores de riesgo, tal como nos lo demuestran los resultados del análisis multivariante de la cohorte de Framingham, además en relación con el tabaco se mantiene una relación entre dosis y respuesta (83, 84). El riesgo de ictus de cualquier tipo relacionado con el tabaco se incrementa en un 50% respecto al que tienen los sujetos no fumadores, independiente del sexo o la edad (85, 86), y el riesgo de enfermedad vascular es relevante incluso con un consumo bajo de cigarrillos (87). El tabaquismo se ha relacionado de forma específica con el IH, en especial con el sangrado subaracnoideo incrementándose el riesgo de sufrirlo en más de un 50 % (88), aunque hay datos contrapuestos (89). En fumadores pasivos existe también un riesgo elevado de enfermedad vascular, tanto para la EAC como para el ictus, y para el cáncer (85, 90, 91). En sujetos expuestos a tabaco ambiental la relación causal no parece ocurrir en forma de dosis y respuesta (92). El efecto del tabaco se explica por mecanismos que favorecen la aterosclerosis, añadiendo los efectos sobre la frecuencia cardíaca y la distensibilidad arterial (93, 94). El tabaquismo por otra parte puede potenciar el papel de otros FR como son la

hipertensión sistólica o la toma de anticonceptivos (95, 96). También el efecto del tabaco es mayor en adultos jóvenes que son portadores del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (97), no obstante el papel de la APOE ha sido objeto de controversias y se han documentado al respecto diferencias raciales en la predisposición al ictus (98). Un trabajo reciente encontró mayores niveles de triglicéridos, colesterol total y LDL con el alelo $\epsilon 4$, concluyendo que este polimorfismo era un determinante independiente de arterioesclerosis (99).

Diversos tóxicos han mostrado su relación con la patología vascular cerebral (100, 101), en este sentido tenemos como ejemplos la marihuana, la cocaína y las anfetaminas, o sus derivados que pueden producir tanto ictus IS como IH incluyendo además la hemorragia subaracnoidea (HSA) (102, 103). En un estudio de casos y controles el abuso de cualquier droga aumentó el riesgo de padecer un ictus en más de 6 veces (104). En pacientes con FR vascular las posibilidades están incrementadas más aún con el uso de cocaína (105). Los tóxicos condicionan la aparición de ictus al actuar sobre la presión arterial, la viscosidad sanguínea, la agregación de las plaquetas y el vasoespasmo (106-108).

El tratamiento hormonal sustitutivo (THS) se empleó para la reducción del riesgo vascular en mujeres postmenopáusicas, aunque trabajos posteriores no han encontrado beneficios ni en la mortalidad ni en la tasa de eventos vasculares (109). Por el contrario el riesgo de presentar un ictus se eleva en las pacientes que recibieron THS (estrógenos solos o combinados), especialmente cuanto mayor era el tiempo transcurrido desde la menopausia (110, 111).

El uso de anticonceptivos orales (ACO) se ha asociado a un aumento del ictus y de tromboembolismo pulmonar (TEP), aunque esta relación ha sido

objeto de discusión dada la existencia de estudios inconsistentes y la falta de estudios aleatorizados. La mayoría de los estudios realizados con ACO se han hecho con los de primera generación que tienen un contenido en estradiol ≥ 50 μg (112, 113). Un metanálisis encontró un aumento de riesgo de ictus del 2.75 (95% IC, 2,24 a 3,38) (114), la asociación es con el IS y con la HSA (114-116). El incremento del riesgo es superior si se asocia al consumo de tabaco, o en presencia de trombofilias congénitas como el factor V de Leiden (FVL), o de las mutaciones 20210 del gen de la protrombina, de la enzima Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) o de la hiperhomocisteinemia que se han vinculado a un incremento del riesgo de presentar trombosis venosas cerebrales (117, 118). En el estudio “*Risk of Arterial Thrombosis in Relation to Oral Contraceptives*” (RATIO) las mujeres obesas (OR, 4,6; 95% IC, 2,4 – 8,9), y con historia de hipercolesterolemia también tenían un riesgo aumentado respecto a las que no usaban ACO (OR, 10,8; 95% IC, 2,3 – 49,9) (119). Un metanálisis realizado con ACO de baja carga hormonal mostró un incremento del riesgo comparable (OR, 2,12; 95% IC, 1,56 -2,86) (120). Otros trabajos consideran que el riesgo asociado a los ACO de baja dosis es bajo, estimando la incidencia de IS en un rango de 0,9 a 10 por 100.000 (121, 122), este riesgo se considera inferior al que confiere el embarazo (123).

El ejercicio físico posee efectos beneficiosos sobre la salud al mejorar el perfil lipídico aumentando el colesterol HDL y disminuyendo el colesterol total, colesterol LDL y los triglicéridos (TG) (124-126). También actúa de manera favorable sobre la presión arterial sistólica (PAS) y la diastólica (PAD) (127), además de mejorar la tolerancia a la glucosa (128). Está bien establecido el descenso del riesgo de ictus con el ejercicio moderado en contraposición a los

riesgos de tipo vascular vinculados al sedentarismo (87, 129). Los hombres con una actividad física moderada tienen un 20% menos de riesgo, mientras que aquellos con una actividad física intensa tienen un riesgo un 27 % menor (126).

El cambio de patrón alimentario se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer enfermedad vascular y obesidad, ya que hay mayor presencia de grasa animal en el consumo energético total, en detrimento de los hidratos de carbono y la fibra de origen vegetal, lo cual supone el abandono de la dieta mediterránea (130-132). Los ácidos grasos omega-6 y omega-3 son los principales componentes de los ácidos grasos poliinsaturados, representados por el ácido linoleico (omega-6), que se encuentra en los aceites vegetales, y los ácidos eicosapentanoico (AEP) y docosahexaenoico (DHA) (omega-3), que se encuentran en el pescado. Una revisión de estudios tanto aleatorizados y de cohortes no mostró beneficio del consumo de omega-3 en la dieta o en suplementos dietéticos con la morbimortalidad vascular (133). En relación con el consumo de grasas poliinsaturadas hay estudios que no han encontrado diferencias en la mortalidad total ni la mortalidad vascular aunque sí en la incidencia de eventos vasculares (RR: 0,84; IC 95%: 0,72 a 0,99) (130, 134).

La inclusión de sodio, especialmente en forma de cloruro sódico, en la dieta tiene influencia sobre la presión arterial y ésta, a su vez, sobre los episodios vasculares en general, por el contrario una reducción de sal de la dieta tienen un efecto favorable sobre el control de la presión arterial y el riesgo vascular (135, 136).

Las frutas y verduras condicionan una reducción del riesgo para los ictus de tipo isquémico y hemorrágico, si se seguía una dieta con tres o más piezas de fruta al día (RR: 0,89; IC 95%: 0,83 a 0,97). El beneficio fue mayor en los

que tomaron cinco o más piezas de fruta al día (RR: 0,74; IC 95%: 0,69 a 0,79) (137, 138).

La prevalencia de la obesidad está experimentando un incremento, en población adulta del norte de España se observó una elevación de la misma en el período 1986-1994, de un 4,6% a un 11,4% en varones y de un 6,1% a un 9,8% en mujeres (139). La obesidad es de origen multifactorial, con un componente de predisposición genética y la influencia de factores ambientales, especialmente la vida sedentaria y a las modificaciones del patrón alimentario (140). La obesidad se encuentra asociada a los principales FR vascular como hipertensión arterial (HTA), diabetes o dislipemia (141), llevando así aparejado un incremento en la morbimortalidad vascular y la mortalidad total (142, 143). Se ha demostrado una relación entre el índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m^2 y el riesgo de padecer un ictus IS o IH (144, 145), además de la asociación con la EAC y la mortalidad precoz (146). El ictus también se ha asociado con la obesidad abdominal medida como el índice cintura-cadera (147).

La diabetes (DM) aumenta el riesgo de padecer arteriosclerosis siendo un FR independiente para el ictus (148, 149), la prevalencia de DM en sujetos con IS está entre el 15 y el 33% (150, 151), y el 9,1 % de los ictus recurrentes son atribuibles a la diabetes (152, 153). El riesgo de experimentar eventos vasculares también se encuentra incrementado en sujetos con Glucemia Basal Alterada (GBA) y en la Tolerancia Alterada a la Glucosa (TAG). Por otra parte los diabéticos tienen una prevalencia aumentada de otros FR proaterogénicos, especialmente la hipertensión y la dislipemia, y sufren el ictus a edades más

tempranas (49). En los hombres diabéticos se eleva la probabilidad de sufrir un ictus entre 2,5 y 4,1 veces, y en mujeres, entre 3,6 y 5,8 veces (148, 154).

La relación entre los niveles altos de colesterol y el riesgo de ictus ha constituido un tema de controversia a pesar de que esta relación se halla bien establecida con el riesgo vascular global (155-157). En un metanálisis de datos individuales (61 estudios prospectivos, 55.000 muertes vasculares) el colesterol total se asoció a la mortalidad por cardiopatía isquémica en edades medias y avanzadas. Además observó que por cada unidad (mmol/l) de descenso de colesterol en plasma la mortalidad por cardiopatía isquémica se reducía a la mitad, un tercio y un sexto en ambos sexos, para las edades comprendidas entre 40 y 49 años, 50 y 69 años y 70 y 89 años respectivamente (156).

La mayoría de los estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre el riesgo de ictus y el colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (75, 157, 158), manteniendo esta relación en diversos grupos étnicos (159). En el estudio "*Cardiovascular Health Study*" (CHS) los niveles altos de colesterol HDL se asociaron a un riesgo de ictus disminuido solo en hombres (160), en el estudio ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) no se documentó una relación con el IS (161). En diversas cohortes se ha observado que por cada incremento de 10 mg/dL del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) se produce una disminución del riesgo de ictus del 11-15 % (162). Por otra parte también se ha demostrado una asociación entre los niveles elevados de TG y el riesgo de IS, y con el ictus de gran vaso (163-165). No obstante hay diversidad de datos que en parte guardan relación al hecho de hacer el estudio de los TG en ayunas o posprandiales (161). Además diversas revisiones sistemáticas han analizado la eficacia de diferentes intervenciones

orientadas a la disminución de lípidos en sangre en pacientes con y sin antecedentes de EAC mostrando una disminución significativa del riesgo de ictus con el empleo de estatinas (166-168).

Muchos estudios han encontrado una relación entre niveles bajos de colesterol y un riesgo aumentado de IH. En el estudio MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*) el riesgo de muerte en relación con el IH se multiplica por 3 en presencia de concentraciones de colesterol <160 mg/dL respecto al correspondiente riesgo con los niveles de colesterol superiores (169, 170). En el estudio APCSC (*Asia Pacific Cohort Studies Collaboration*) hubo una disminución del 20% de riesgo de IH (95% IC, 8% a 30%) por cada 1 mmol/L (38.7 mg/dL) de incremento del colesterol, total (171). No obstante esta relación no se ha documentado en otros trabajos (172).

La lipoproteinlipasa A o Lp(a) es un complejo lipoproteico de baja densidad, donde la apolipoproteína B-100 está unida de forma covalente con la glicoproteína, apoproteína(a). Este complejo lipoproteico tiene una similitud estructural con las lipoproteínas de baja densidad (LDL), actuando en el transporte del colesterol a los tejidos y arterias. La apoproteína (a) también tienen analogía estructural con el plasminógeno, sin tener actividad enzimática, así favorece la inhibición de la fibrinólisis y la aterogénesis. Se encuentra implicado en estados protrombóticos, que favorece la ateromatosis, y que tiene propiedades antifibrinolíticas y promotoras de la ateromatosis. Valores elevados de Lp(a) se han asociado a un aumento de riesgo de enfermedad vascular cerebral y de EAC (173, 174). En el estudio ARIC la incidencia de ictus isquémico se encontraba aumentada un 80% (RR, 1,79; 95% IC, 1,32-2,42) en pacientes con elevación de los niveles de Lp(a) tras ajustar por edad,

sexo y raza (175). La Lp(a) se encuentra asociada además a las características de la placa incluida con el grado de estenosis (176).

De forma genérica se considera a la hipertensión arterial (HTA) como el principal FR después de la edad tanto para el IS como para el IH, incrementando entre tres y cinco veces el riesgo de padecer un ictus (41). La relación entre ictus e HTA es fuerte, graduada, consistente, independiente, predictiva y etiológicamente significativa, incrementándose el riesgo de ictus de forma paralela a la elevación de la HTA (177, 178). La prevalencia de la HTA está en ascenso, especialmente la sistólica; este incremento se relaciona en parte con el de la obesidad y el sobrepeso (179-181). Además los sujetos con hipertensión con frecuencia asocian otros factores de riesgo como obesidad, sedentarismo o consumo de alcohol (182). Los valores de referencia para considerar un sujeto como hipertenso se han ido corrigiendo siendo en la actualidad los límites inferiores a los considerados previamente y hoy se propugna definir la hipertensión por encima de 115/75 mmHg (177). En este sentido señalaremos con resultados de un metanálisis reciente que postula que la prehipertensión (TAS \geq 120-129 y TAD \geq 80-84) se asocia a morbilidad por ictus tras ajustar por múltiples FR vasculares (183).

La prevalencia de la HTA en nuestro país está próxima al 46,8% de la población de entre 35 y 64 años según un estudio que evaluaba la prevalencia de HTA en seis países europeos, Canadá y Estados Unidos. El estudio mostraba una mayor prevalencia de HTA en Europa y un patrón similar para las tasas por muerte por ictus (184). Este hecho ya se observó en el estudio internacional MONICA (*Monitory Cardiovascular Diseases*), que constató una relación similar entre hipertensión e incidencia de ictus (185). En nuestro país

el control de los factores de riesgo y el cumplimiento de las recomendaciones al respecto es muy pobre, de esta manera el control deficiente de las cifras de presión arterial y la presencia de hipertrofia ventricular izquierda (HVI) se asociaron significativamente con la mortalidad por ictus (186, 187).

El síndrome metabólico (SM) es una combinación de factores de riesgo en un individuo que incrementa el riesgo vascular, se incluyen entre estos factores a la obesidad abdominal, la dislipemia aterogénica (elevación de los triglicéridos y disminución del colesterol HDL, la HTA, la DM y la elevación de la glucemia en ayunas. Posteriormente se ha ampliado la definición incluyendo la inflamación subclínica, además de los trastornos de la trombosis, fibrinólisis y de función endotelial que se ha demostrado tienen una transmisión genética (188-190). La resistencia a la insulina se describe como un estado fisiopatológico en el que su efecto es inferior al esperable y tiene como consecuencia la reducción de la captación periférica de glucosa (en el músculo y la grasa), un aumento de la producción de glucosa hepática, y de la secreción compensatoria de insulina pancreática (191). Los criterios más ampliamente aceptados para su definición son los de la ATP III-modificados (*Adult Treatment Program*) del año 2006, así como los criterios de la IDF (*International Diabetes Federation*) del año 2005. La prevalencia del SM en nuestro entorno se estima de un 25% en hombres y un 20% en mujeres (192, 193), y entre los pacientes con IS es del 40-50% (194, 195). El riesgo de enfermedad vascular y muerte es un 78% superior en pacientes con SM, siendo mayor en mujeres que en los hombres y en sujetos sin EAC de base (196). Estos hallazgos son concordantes con los datos ofrecidos por cohortes

prospectivas posteriores en los que está aumentado el riesgo de ictus de cualquier tipo (197, 198).

Las cardiopatías embolígenas agrupan un conjunto heterogéneo de entidades que representan una causa importante de ictus. Los pacientes afectados de un IAM se pueden complicar con la aparición de un ictus secundario a un embolismo, lo que ocurre hasta en el 1,2% de los IAM (199, 200). Entre las circunstancias que la favorecen están edad, la HTA, la fibrilación auricular (FA), el ictus previo o una fracción de eyección reducida, áreas discinéticas o la presencia de trombos intramurales (199, 201, 202). La miocardiopatía dilatada y otras entidades con una fracción de eyección baja también están en riesgo de presentar eventos embólicos, aunque es relativamente bajo aún en presencia de un trombo intracavitario (203).

La FA no valvular (FANV) es el trastorno del ritmo cardíaco más frecuente, cuya prevalencia aumenta con la edad y es el factor de riesgo más importante para el ictus tras la hipertensión, asociándose a ictus más graves y con mayores mortalidad y discapacidad (204, 205). La enfermedad valvular y el recambio de las mismas también se han asociado a un aumento del riesgo de eventos vasculares cerebrales de origen embólico. El aumento del riesgo es mayor en las válvulas mecánicas que en las biológicas, precisando por este motivo un rango mayor de anticoagulación para una prevención adecuada del riesgo de embolias (206, 207). La estenosis mitral es el ejemplo clásico de patología valvular asociado al riesgo embolígeno, que está especialmente incrementado en los casos que asocian FA (208, 209).

El Prolapso de la válvula mitral (PVM) es una afección valvular frecuente generalmente benigna, aunque en ciertas circunstancias el riesgo de embolias

se encuentra elevado. Entre estas últimas tenemos una regurgitación significativa, el grosor de la válvula mitral (>5 mm) o el tamaño de la aurícula izquierda (>50 mm), la presencia de un trombo en aurícula izquierda o de FA (210-212).

La persistencia de un “Foramen Ovale Permeable” (FOP) es frecuente en la población general dado que se ha objetivado hasta en un 25,6%, el defecto aneurismático del septo (ASA) es menos frecuente y puede afectar hasta al 2% de la población general (213, 214). El hecho de que la presencia de un FOP puede ser una causa de ictus es una cuestión muy debatida, aunque hay estudios que sí demuestran una relación especialmente ante la presencia de un ASA (213, 215).

La migraña, especialmente la que asocia la presencia de aura migrañosa se ha vinculado a un aumento del riesgo vascular cerebral y este riesgo se encuentra incrementado con el uso concomitante de ACO (216-219).

En diversos estudios se ha demostrado que roncar representa un factor de riesgo para el IS independientemente de otros factores de confusión como pueden ser la HTA, la EAC, la obesidad o la edad (220, 221). Esta patología presenta una asociación con variaciones topográficas en la localización arterial preferente de la afectación arteriosclerótica, de esta manera vemos que el riesgo es mayor en la arteria carótida que en la femoral (222). En la línea de estos hallazgos tenemos un estudio observacional encontró en pacientes con “Síndrome Apneas-hipopneas graves de sueño” (SAHOS), es decir más de 30 por hora de sueño, tenían un mayor riesgo de eventos cardiovasculares mortales y no mortales. Los pacientes que recibían tratamiento con presión positiva continua (CPAP) no diferían de los sujetos sanos en relación con el

número de eventos cardiovasculares (223). El SAHOS tiene una asociación independiente con el riesgo de ictus y muerte (HR, 1.97; 95% IC, 1.12- 3.4; $P<0.01$), tras ajustar por edad, sexo, raza, hábito tabáquico, consumo de alcohol, IMC, FA e HTA (224, 225). El riesgo para desarrollar un IS en relación con el índice de apnea-hiponea basal está elevado 2-5 veces (HR, 2.52; 95% CI, 1.04 - 6.01; $P<0.04$). Se postula como base de esta relación causal el empeoramiento de la HTA con la que mantiene una relación dosis-respuesta, el empeoramiento de la enfermedad cardíaca, la reducciones en el flujo sanguíneo cerebral (FSC), pérdida de la autorregulación vascular cerebral, pérdida de la función endotelial, aterogénesis acelerada, inflamación y embolismo paradójico en pacientes con FOP (226-229). En pacientes con trastornos de sueño graves y evolucionados hay un aumento del riesgo de arritmias auriculares y de bloqueo aurículoventricular cuando la saturación de oxihemoglobina es inferior al 65 % (230-232). También se ha encontrado un mayor número de lesiones isquémicas silentes en los estudios de RMN cerebral en los controles sanos o respecto a los sujetos con SAOS leve(233).

El síndrome antifosfolípídico (SAF) es una entidad de origen multifactorial, que puede ser primaria o asociada a otras enfermedades autoinmunes. En el SAF la presencia en plasma de anticuerpos antifosfolípidos de membrana (AFL), especialmente los anticuerpos anticardiolipina y el anticoagulante lúpico (AL), incrementan la tendencia a la morbilidad obstétrica y a los eventos trombóticos tanto en hombres como en mujeres, con una tasa anual que puede llegar al 3,8 % (234-236). No obstante el papel de los AFL en la aparición de un primer evento vascular o en la aparición de recurrencias ha sido objeto de controversia, por un lado la mayor parte de los trabajos son no

controlados, además hay trabajos en los que no se muestra su papel predictivo en las recurrencias o en el patrón de respuesta a la medicación antitrombótica en la prevención secundaria (237).

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido producto del metabolismo de la metionina, que se incrementa con frecuencia en situaciones en las que la actividad enzimática de las diferentes vías está reducida como entre ellas la cistationina beta sintetasa y la metilendetrahydrofolato reductasa (MTHFR). También se puede aumentar su concentración por la falta de depuración renal o a por la carencia de otros cofactores como la piridoxina, el ácido fólico o la cobalamina. La hiperhomocisteinemia se ha vinculado con un aumento del riesgo de enfermedad vascular en 2-3 veces, incluyendo al IS, especialmente en los casos en los que se encuentra ligada a las mutaciones del gen de la MTHFR (238-242). Además en diversos estudios se ha establecido la relación entre el Grosor Íntima Media (GIM) y la estenosis carotídea con los niveles elevados de Hcy aunque hay datos contradictorios (243-245). En este sentido los trabajos realizados con el empleo de ácido fólico para prevenir la recurrencia de episodios vasculares han sido inconsistentes, aunque en algunos se ha encontrado una disminución significativa de la recurrencia de eventos vasculares (246, 247).

La inflamación afecta al inicio, crecimiento y desestabilización de las lesiones ateroscleróticas (248). Algunos marcadores séricos de inflamación como el fibrinógeno, amiloide sérico, Lp-PLA2, la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRus) e interleukina 6 (IL6), se han propuesto como marcadores de riesgo vascular (249-251). Se ha postulado una relación entre Lp-PLA2 y el riesgo de ictus y de EAC (252-254). Otra vía para evaluar el rol

de la inflamación como FR es analizar la incidencia de la enfermedad vascular en personas con enfermedades inflamatorias sistémicas como la artritis reumatoide (AR) y el lupus (LES), en numerosos estudios se ha documentado un aumento del riesgo con una Odds Ratio de 1.4 a 2, que a su vez estaría aumentado en caso de que existan otros FR asociados (255-258).

También las infecciones crónicas juegan un papel parecido en acelerar la aterosclerosis, en este sentido se han implicados diversos virus y bacterias como el *Helicobacter pylori*. No obstante, no se ha obtenido beneficio al emplear antimicrobianos a la hora de prevenir eventos vasculares (259-261). Se han postulado como participantes en la patogenia de la aterosclerosis asociada a inflamación e infecciones, y la inducción de reactantes de fase aguda procoagulantes como el fibrinógeno (262). A este respecto se ha comprobado en estudios casos-control y de cohortes una disminución del riesgo de ictus vinculada a la vacunación para la gripe (263, 264).

Actualización en genética del ictus

Para la mayoría de las enfermedades comunes, incluyendo enfermedades cardíacas, DM, HTA y cáncer, múltiples factores genéticos y ambientales influyen en el riesgo que tiene un individuo de verse afectado. Esta complejidad contrasta con el patrón de herencia de enfermedades monogénicas, en el que la presencia o ausencia de alelos de enfermedad predice por lo general completamente la presencia o ausencia de la enfermedad (aunque la edad de debut y la gravedad de la misma pueden variar). La susceptibilidad a la enfermedad puede estar condicionada por la presencia de polimorfismos comunes en el ADN.

Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es una variación de la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) que afecta a una sola base adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) de una secuencia del genoma. Los SNPs son generalmente bialélicos y constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humana, apareciendo de media cada 1.300 bases a lo largo del genoma humano (265). La distribución genómica de SNPs no es homogénea, los SNPs generalmente ocurren en regiones no codificantes con más frecuencia que en regiones codificantes o, en general, donde la selección natural está actuando y fijando el alelo del SNP que constituye la adaptación genética más favorable (266). Los SNPs que no están en regiones codificantes de proteínas pueden afectar al proceso de traducción, especialmente en el ensamblaje (*splicing*) de genes, unión a factor de transcripción, la degradación del ARN mensajero, o la secuencia de ARN no codificante. La expresión de genes afectados por este tipo de SNP se conoce como un ESNP (expresión SNP) y puede ser corriente arriba o corriente abajo del gen (*upstream vs downstream*). Los SNPs dentro de una secuencia de codificación no cambian necesariamente la secuencia de aminoácidos de la proteína que se produce, debido a la degeneración del código genético. SNPs en la región codificante pueden ser en primer lugar sinónimos (o mutación silenciosa), estos no afectan a la secuencia de la proteína, y por otra parte tenemos los no sinónimos que pueden cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. En este segundo grupo los SNPs pueden ser “sin o con sentido”.

Encontramos que se han comunicado más de 600 asociaciones positivas entre las variantes genéticas comunes y enfermedades (267), lo que tendría una enorme importancia para la prevención, predicción y tratamiento de

las enfermedades más comunes. No obstante la mayoría de las asociaciones descritas no son robustas y con frecuencia no son reproducibles. Por ello es necesario ser cauteloso al inferir conclusiones de las asociaciones entre variantes genéticas y la susceptibilidad a la enfermedad.

Como se ha comentado el ictus es una enfermedad compleja en cuya patogenia intervienen múltiples factores siendo la herencia uno de ellos (124), apoya su papel patogénico la presencia de una historia familiar y los estudios realizados en gemelos (55, 56). La historia familiar puede ser determinante en una medida similar a lo que ocurre con otras enfermedades complejas como el cáncer, enfermedades inmunes y vasculares (56, 267). Un metanálisis de estudios de cohortes ha mostrado que una historia familiar de ictus incrementa el riesgo de sufrir un ictus un 30 % [odds ratio (OR), 1,3; 95% IC, 1,2 a 1,5, $P < 0.00001$]; el riesgo en gemelos monocigotos se eleva 1,65 % respecto a los dizigotos (57). Los estudios llevados a cabo en gemelos respaldan el papel del factor genético, no obstante el número de casos evaluados hasta la fecha es pequeño y el intervalo de confianza es amplio (268). Se estima que la herencia juega un papel relevante en el ictus en un 37,5 % de los casos de IS, distribuyéndose por subtipos de forma que varía entre un 40.3% para la enfermedad de gran vaso, un 32.6% para el cardioembólico y el 16.1% para la enfermedad de pequeño vaso (61).

El riesgo aumentado de ictus podría estar en relación con diversos mecanismos como pueden ser la herencia de los factores de riesgo de ictus, o heredar una susceptibilidad a los efectos de los factores de riesgo, además de compartir en el entorno familiar factores culturales, ambientales o de estilo de vida y a la interacción entre factores ambientales y genéticos. El papel de la

genética es complejo al tratarse de una enfermedad poligénica, que se modifica por diversas interacciones. Se cree que la combinación de diversas variantes alélicas puede modificar el riesgo individual a través de diversas interacciones no siempre aditivas (267, 269).

Dado que el ictus y el infarto de miocardio (IAM) comparten muchos factores de riesgo y patogenia se han hecho intentos de vincular los polimorfismos asociados a IAM, pero no se ha encontrado significación estadística a la hora de establecer la relación (70). Muchos de los factores de riesgo comparten componentes ambientales o genéticos, lo que ocurre con los tradicionales como la hipertensión o la diabetes y con los otros factores de riesgo emergentes como puede ser la hiperhomocisteinemia (66, 67).

Los algoritmos predictivos o “*multilocus genetic risk score*” se han propuesto para valorar el riesgo que se deriva de la adición de los múltiples riesgos que confieren cada una de las variantes comunes. En este sentido hay algoritmos, que combinan EAC, FA, presión arterial sistólica (PAS), y que han demostrado capacidad predictiva del riesgo de ictus y también han podido ser replicados (270). No obstante su capacidad predictiva es limitada (270), esto también se demostró en un trabajo que sumaba los polimorfismos genéticos al *Framingham Stroke Risk Score* (271).

Métodos diagnósticos en genética

Hay tres métodos para la aproximación a la genética del ictus, en primer lugar tenemos los análisis de ligamiento, la aproximación a los genes candidatos y los estudios de asociación a genoma completo (GWAS). El estudio de ligamiento analiza múltiples variantes genéticas en muchas

generaciones familiares, y se basa en identificar asociaciones entre marcadores cromosómicos y fenotipos de enfermedad. Estos estudios son útiles para los trastornos mendelianos en enfermedades monogénicas, cuando el riesgo que confieren los genes en cuestión es alto, pero son menos útiles en enfermedades poligénicas en las cuales múltiples genes contribuyen a una parte del riesgo global.

Otro método consiste en buscar en genes candidatos las variantes genéticas que generalmente eran polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), evaluando diferencias en su frecuencia en estudios de casos-control. La selección de los genes se hacía partiendo del conocimiento de la patogenia de la entidad a estudio y de las posibles funciones en las que pudiesen estar implicados cada gen (272). En el estudio se analizan los genes candidatos y los loci correspondientes. Los polimorfismos con mayor información se denominan tagSNPs ya que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con otros, lo que disminuye la necesidad de genotipado. No obstante este método tiene limitaciones y dificultades para replicar los hallazgos (273), además de que solo sirve para SNPs ya descritos y no para nuevos genes. Las causas de los fallos de los estudios de asociación de genes candidatos han sido contar con una muestra insuficiente, imposibilidad de replicar los hallazgos inicialmente teorizados, la incapacidad para clasificar por subtipos etiológicos o en el fenotipado o un fallo para establecer la asociación por subtipos.

Otra alternativa son los Estudios de “Variación en el Número de Copias”, que responden a variaciones estructurales del genoma. Estas se pueden deber a deleciones, duplicaciones o inversiones, produciendo así copias de un

fragmento del DNA y modificación de las proteínas relacionadas (274). Su desarrollo estará ligado a proyectos colaborativos de genotipado masivo.

La aproximación “Asociación genómica amplia-*Genome Wide Association*” (GWAS) emplea la tecnología de chips de ADN o “*microarray*” para el genotipado total del genoma de un individuo valorando múltiples SNP, con ello consigue una valoración amplia del genoma. De esta manera se ha logrado nuevos genes y/o regiones que contribuyen a numerosas enfermedades complejas, aunque su aplicación en el ictus ha sido lenta (267, 275, 276). Posteriormente es necesario realizar un estudio de casos control o de cohortes comparando la frecuencia de los SNPs individuales en ambos grupos. Los estudios GWAS han contribuido al conocimiento de la HTA, la hiperlipidemia o la DM. La mayoría de las nuevas variantes caracterizadas conllevan pequeños incrementos en el riesgo (277). Dada la heterogeneidad del ictus ha sido menos satisfactoria la efectividad de los estudios de asociación respecto a su utilidad en otras enfermedades, estando lastrada generalmente por los problemas derivados del tamaño muestral y de los posibles errores en el genotipado. Los estudios de casos-control se asocian a sesgos en aquellos casos en lo que la enfermedad aumente el riesgo de muerte precoz y las muestras se tomen únicamente de supervivientes vivos, los de cohortes obvian este sesgo aunque la disponibilidad de casos es limitada. Los estudios GWAS han identificado algunas asociaciones robustas con el IS para subtipos etiológicos. Existen diversas colaboraciones multicéntricas como “*Stroke Genetics Network (SiGN)*” financiada por el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (278) o el “*Metastroke Collaboration*” (124), que generan líneas de trabajo ambiciosas para el desarrollo de la investigación.

Los estudios en la actualidad se limitan a cubrir el exoma, mientras que los estudios para secuenciar todo el genoma permitirán ampliar la identificación de variantes menos frecuentes (279).

Tal como hemos reseñado se han desarrollado escalas de riesgo en las que hay una adición de alelos de susceptibilidad, valorando el riesgo relacionado con cada uno de ellos. De cara a integrar la información y la capacidad predictiva de cada uno de estos alelos (280). Las redes bayesianas son herramientas estadísticas se han constituido como otro instrumento útil, emplean las variables ya descritas para la estimación de las no conocidas y permiten valorar las influencias recíprocas entre una causa y su efecto (281).

En los últimos años se han hecho descubrimientos que revelan la existencia de amplias redes regulatorias basadas en el Ácido desoxirribonucleico (DNA). Existen ácidos ribonucleicos (RNA) derivados de secuencias de DNA no codificantes de proteínas. Entre estos se incluyen los RNA de transferencia, los nucleolares pequeños y grandes, editores de RNA y los ribosomales. En los últimos años se han hecho descubrimientos que revelan la existencia de amplias redes regulatorias basadas en microRNAs (282, 283). Se estima que cada miRNA puede regular cientos de genes (284). Las combinaciones de alelos miR-146aC>G y miR-146aG/-149T/-196a2C/-499G se han asociado significativamente con la prevalencia de IS y con la presencia de lesiones en RMN subclínicas (285). Se han descrito también ARN no codificantes de mayor tamaño los “*Long non-coding*” RNA. Entre los avances recientes está la descripción de la expresión diferencial de RNA no codificante antisentido en el locus INK4 (ANRIL), que se transcribe del locus Chr9p21 en el locus INK4/ARFr (286). El concepto emergente sugiere que el

ANRIL constituye una modificación epigenética y que puede actuar de modulador de la función génica y del riesgo vascular (282, 283).

Polimorfismos e ictus en estudios de asociación y GWAS

El sistema Renina angiotensina (SRA) juega un importante papel en el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis cardiovascular(287). Diversos estudios han demostrado numerosos polimorfismos que afectan a su función (288). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es clave en el SAR y juega un importante papel en el remodelado vascular, la aterosclerosis y el IS (289, 290). El gen de la ACE gene se localiza en el cromosoma 17q23 y se ha identificado un polimorfismo (I/D, dbSNP rs4646994) basado en la presencia (inserción I) o ausencia (delección D) de un fragmento 287-bp DNA que se asocia a una elevación de ECA y se ha postulado como una potencial susceptibilidad para el IS obteniendo datos no concluyentes (291-294). Por otra parte un metanálisis concluyó que la presencia de alelo D del polimorfismo ACE I/D es un marcador de susceptibilidad para el IS con baja penetrancia (295).

La angiotensina II (ATII) es el principal péptido biológicamente activo, posee propiedades oxidantes y proinflamatorias y se une al receptor tipo 1 de la AAT II (ATIIr) cuyo bloqueo disminuye la presión arterial (296). También se ha descrito una asociación entre diversas variantes del ATR1 relacionados con la obesidad, hipertensión, masa del ventrículo izquierdo y la aterosclerosis (297-299). Se ha planteado con el ictus la relación del polimorfismo (A1166C) del AT1R que alteraría el balance de SRA (300-302), no obstante ni estudios posteriores, ni un metanálisis han confirmado esta relación (288, 302).

También se han establecido relaciones entre variantes en el gen de la aldosterona con la enfermedad cerebrovascular y la muerte por ictus (303). Estudios de intervención con fármacos que inhiben el SRA han demostrado un beneficio en la incidencia de ictus y de enfermedad vascular en general (304, 305). Un metanálisis del polimorfismo M235T del angiotensinógeno sugiere aumento del riesgo de infarto de miocardio y de IS en población asiática (306).

El Óxido Nítrico (ON), es un gas regulatorio pluripotente en el sistema vascular que puede tener un efecto antitrombótico al reducir la adhesión y agregación plaquetarias (307, 308). El ON se sintetiza a través del gen de las isoenzimas de la óxido nítrico sintetasa, de la que hay 3 variantes que son endotelial (eNOS), neural (nNOS), y la inducible por citocinas (iNOS). La eNOS es la fundamental en la síntesis de ON y de mantener el flujo sanguíneo cerebral (309). Los genes que codifican la eNOS se localizan en el cromosoma 7 (7q35–q36), y hay 3 polimorfismos habitualmente considerados, 4b/a, T-786C and G894T en relación con la patogenia del ictus, además de haberse relacionado con la hipertensión, los niveles de colesterol total y del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (310-313). Por otra parte un metanálisis de 2.011 en población asiática también apoya esta relación (313). Hay un metanálisis posterior que encuentra asociación entre eNOS T-786C e IS especialmente en la población entre 60 y 65 años (314).

El sistema de las paroxonasas (PON) comprende 3 genes que comparten 60-65% de similitud en los aminoácidos (315), que codifican 3 isoenzimas las cuales participan en prevenir la oxidación de los lípidos. Los polimorfismos genéticos asociados a las PON afectan a la actividad de la

enzima y se han asociado a un incremento en el riesgo de IS, aunque con datos controvertidos (316, 317).

El gen de la paraoxonasa 1 (PON1) se localiza en el cromosoma 7q21.3–22, y codifica una enzima con una amplia especificidad de sustrato y cuyas funciones no están completamente descubiertas (318), así se ha implicado en la aterogénesis en virtud de su unión a partículas HDL y en la prevención de la oxidación de las LDL, además se ha especulado sobre su influencia en el grosor íntima-media y en la inflamación con un papel potencial en la ateroprotección (319-321). Otro importante sustrato para la PON1 puede ser la homocistein tiolactona, que se correlaciona negativamente con la N-homocisteinemia y sugiere otro mecanismo beneficioso en la prevención de la aterosclerosis (322).

Los niveles aumentados de PON1 se han asociado en algunos estudios con mayores niveles de HDL (323), que poseen la mayor capacidad predictiva negativa para enfermedad vascular. No obstante en estudios realizados en EAC se ha planteado un mayor valor pronóstico en relación con la actividad de arilesterasa, que mide la función de la PON 1, respecto a la medida de la PON 1 (324). En un trabajo en pacientes con ictus se postula que el cociente entre PON y arilesterasa predice mejor el pronóstico en términos de discapacidad, respecto a la capacidad predictiva de cada uno por separado (325). Este gen se ha investigado como potencial factor de riesgo para fenotipos relacionados con la aterosclerosis, incluyendo la EAC, EAP e IS (326, 327). La actividad de la PON 1 depende de diversos factores, entre los que se encuentran factores genéticos, edad, sexo, estilo de vida y fármacos (324).

Los polimorfismos de la PON 1 rs662 (c.575A>G o p.Gln192Arg) y rs854560 (c.163T>A o p.Leu55Met), se han relacionado con la patogenia de la EAC, ictus y EAP (327, 328). Diversas revisiones han confirmados el papel del alelo G de rs662 en un discreto incremento del riesgo de IS (por-alelo OR=1.12) y no del segundo (328, 329). En un análisis combinado de estudios se ha evidenciado que la asociación del polimorfismo Gln192Arg SNP con el riesgo de ictus (330, 331). También se ha descrito que un polimorfismo funcional de la PON 1 interfiere la unión con microRNA e incrementa el riesgo de ictus y de ateromatosis carotídea (332).

Las variaciones genéticas del gen de la PON 1 tienen relación con el “Grosor Íntima Media” (GIM), teniendo el G-824A una capacidad predictiva independiente (327). Las PON 2 y 3 también han sido implicadas como genes candidatos en la patogenia de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares debido a su capacidad de atenuar la peroxidación de los lípidos (333-335). Los bajos niveles de actividad de PON se han asociado a un incremento del riesgo vascular (316), aunque se han dado resultados discordantes en relación con diferencias étnicas (336-338). En un metanálisis se ha demostrado una asociación nominal significativa entre el polimorfismo rs662 e IS (P = 0.0100, OR = 1.08 [95% IC = 1.02-1.15])(339). En otro trabajo en población china se ha encontrado también una asociación nominal entre rs705381 (-162) con el ictus de forma global y con el isquémico, pero no con el hemorrágico, entre rs854571 (-824) e ictus, con el alelo T como factor protector (335).

La Paraoxonasa 2 (PON2) se expresa de manera ubicua, estando presente en múltiples tejidos humanos como pulmón, hígado, corazón e

intestino (331), y al contrario que las PON 1 no parece estar asociada a las partículas de HDL (340). También se considera con propiedades antiaterogénicas al proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (337). Hay 2 polimorfismos frecuentes del gen de la PON 2, que serían *PON2-148* [C/G: Ala (A)/Gly (G)] y *PON2-311* [C/G: Cys (C)/Ser (S)], y el *PON2-148* "G" (variante G), asociados a altos niveles basales de glucosa; el *PON2-311* "G" (alelo S) se ha asociado a EAC (341). A pesar del interés creciente hay menos información acerca de la PON2 y sus funciones.

Pan y colaboradores encontraron que el polimorfismo PON2 Ser311 se asociaba a EAC (342), por el contrario otro trabajo solo encontró asociación en los sujetos con tabaquismo (343). Este polimorfismo se ha descrito en pacientes con ictus de gran vaso (344), aunque hay datos contrapuestos (330, 337). Un metanálisis posterior tampoco encontró asociación, aunque un análisis por etnias sugería una posible asociación en población europea (345). Este polimorfismo se ha asociado a ictus de mayor gravedad (346). Otro trabajo, realizado por Cozzi y colaboradores encontró que el polimorfismo PON2 Cys311Ser un cofactor de riesgo en la asociación anterior de PON1 y con otros factores de riesgo (347).

El ictus de gran vaso se ha relacionado con el loci PHACTR1, que ya había sido descrito en el infarto agudo de miocardio (61). El riesgo diferencial de la aterosclerosis en la población puede reflejar variaciones en los genes que modulan la respuesta inflamatoria a los lípidos oxidados en la pared arterial (62, 348, 349), influyendo así los genes en la patogenia de la aterosclerosis (64, 350). En relación con la patología de gran vaso se ha demostrado en estudios de gemelos que las características de la placa (ecogenicidad, número,

lateralidad) tienen un papel la herencia hasta en el 78 % de los casos (349, 351). En un trabajo realizado en 2011 en población dominicana residente en Estados Unidos se describió la asociación de 7 genes relacionados con la inflamación (8TNF, NOS2A, IL6R, TNFSF4, PPARA, IL1A, TLR4) y de 2 genes relacionados con la función endotelial (ITGA2, HABP2) con los fenotipos de la placa carotídea; además se identificó un haplotipo VCAM1 relacionado con la placa carotídea calcificada (352), ninguno de los genes relacionados con la inflamación se asoció con el grosor íntima-media (GIM).

La identificación del locus 9p21 (Chr9p21) ha sido un descubrimiento de primer orden en la genética cardiovascular., su presencia aumenta el riesgo vascular independientemente de los factores de riesgo de convencionales (340), también es independiente de un locus próximo relacionado con la DM (353). De esta forma se postula que Chr9p21 podría afectar la aterosclerosis a través de un mecanismo totalmente nuevo. Otro hallazgo interesante es que la región genómica que comprende el haplotipo relacionado con la EAC es un "desierto de genes", carente de genes codificadores de proteínas anotadas. Los genes codificantes más próximos son 2 inhibidores de quinasa cicloindependiente CDKN2B (codificación p15INK4b) y CDKN2A (codificación p16INK4a y p14ARF), así como la metiltioadenosina fosforilasa (MTAP). CDKN2Ay CDKN2B están involucrados en el control del ciclo celular, y MTAP que interviene en preservar la adenina y la metionina, que es importante para la proliferación de células del músculo liso y en la aterogénesis (354). La región contiene un ARN largo no codificantes intergénico anti sentido denominado ARN en el INK4 locus (ANRIL). Un sinónimo es CDKN2BAS (CDKN2B ARN anti sentido) (355). Los estudios recientes han demostrado que la expresión

está regulada por ANRIL Chr9p21 y podría constituir en un factor clave para la comprensión la fisiopatología del locus.

Diversos estudios han investigado la relación entre Chr9p21 con fenotipos que están posiblemente relacionados con la EAC, se han detectado asociaciones robustas con un aumento de la reactividad plaquetaria (356). Otra asociación es la de EAC y periodontitis (357, 358).

Se ha descrito una fuerte asociación entre la región Chr9p21 y la placa carotídea (OR 1.31–1.46), además de la asociación con la progresión de la placa aunque no con el GIM (359, 360). Su papel en la placa no es importante en fases iniciales de la enfermedad ateromatosa sino en la progresión, esto se apoya por la falta de relación con la vasodilatación braquial como un marcador de etapas iniciales (361). Una variante en el cromosoma 9p21 que fue descrita en la cardiopatía isquémica se ha asociado con el IS ateromatoso de vaso grande y a muchas otras manifestaciones de enfermedad vascular como la EAP, insuficiencia cardíaca y mortalidad cardiovascular (340, 362). Esta variante también se ha vinculado con los aneurismas intracraneales y de aorta abdominal (363). El efecto no tiene relación con los factores de riesgo tradicionales, además se trata de una región del genoma no implicada en la codificación de proteínas. También se ha asociado con el IS cardioembólico y la fibrilación auricular el locus del gen PITX2 en el cromosoma 4q25 (364); respecto a la fibrilación auricular se han descrito posteriormente su asociación con otros SNP (365).

El “*Wellcome Trust Case Control Consortium Ischemic Stroke*” GWAS identificó una asociación novel en 7p21; en el gen HDAC9 (366) que codifica para una histona deacetilasa 9. Esta asociación se limita al ictus ateromatoso

de vaso grande, influyendo en el GIM y un aumento en la expresión del mRNA (367). El gen probablemente participa de la aceleración de la aterosclerosis y el ácido valproico actúa inhibiendo el gen y se asocia a una menor tasa de ictus (368).

El polimorfismo KIV2 está implicado en el 69% de la variabilidad del nivel de Lp(a) (369, 370), y con una disminución del riesgo de Infarto agudo de miocardio(371). Se ha establecido la relación de los polimorfismos de la lipoproteín lipasa Ser447Ter y Asn291Ser, aunque su relación con el ictus es controvertida (372), un metanálisis encontró que el polimorfismo Ser447Ter se relaciona con un menor riesgo de ictus especialmente el aterosclerótico (373). Se ha encontrado que la asociación entre Lp(a) parece tener relación solo con ciertas localizaciones de la enfermedad aterosclerótica como la EAC y la EAP, pero no con el ictus (374).

Trabajos en población asiática han demostrado un SNP en una proteína-kinasa (PKC), PRKCH, que se ha asociado a enfermedad de pequeño vaso y a lesiones silentes en RMN (375). Las lesiones de sustancia blanca en RMN son un marcador de enfermedad de pequeño vaso y se estima que la herencia juega un papel hasta en el 70% de los casos (68, 376, 377). Las bases genéticas están aún por dilucidar y un metanálisis de 19 genes candidatos, entre los que se incluían APOE, MTHFR y angiotensina, no identificó una asociación (378). También se ha vinculado la patología de pequeño vaso tanto isquémica como hemorrágica con el genoma mitocondrial y variantes de los genes de la fosforilación oxidativa (379). Un trabajo reciente encontró asociación entre las lesiones de sustancia blanca y un nuevo locus en el cromosoma 17q25, aunque sin relación con el ictus lacunar, por ello se

plantean que no actúa sobre la arteriopatía responsable del infarto lacunar (380).

La transtiretina es una de las muchas proteínas que pueden causar amiloidosis, encuadrándose en un grupo de enfermedades caracterizado por el depósito extracelular de proteínas fibrilares patológicas insolubles en órganos y tejidos (381). El depósito de amiloide está condicionado por la desestabilización de la misma, proceso que puede ser bloqueado por tiroxina, y por las drogas que estabilizan tetrámeros de transtiretina (382, 383). Estudios de genotipado para 2 variantes genéticas en el gen transtiretina (TTR), R104H y T119M, que determinaron la asociación de genotipos con niveles plasmáticos de transtiretina, las medidas de la función tiroidea, el riesgo de la enfermedad vascular y la esperanza de vida, concluyeron que estas variantes disminuyeron el riesgo de enfermedad cerebrovascular, aumentando la esperanza de vida en la población general (384).

El fibrinógeno está elevado en las patologías inflamatorias juega un papel importante en la trombosis y tiene capacidad predictiva la patología vascular (385, 386). En metanálisis de GWAS se ha establecido la relación de diversas variantes génicas que afectan a los niveles de fibrinógeno (387), aunque metanálisis posteriores no han encontrado relación causal con el ictus (388).

En un estudio, sobre la base de un tagSNP se demostró que el polimorfismo rs380092 en IL-1RN mostró una asociación con la asociación con el IS y en especial con el ictus criptogénico (389).

Se ha demostrado relación entre vinculados a la inflamación y el riesgo de ictus, entre ellos los que codifican el factor de necrosis tumoral α (TNF α) que tienen una acción pro inflamatoria (390-392). Por contra se han descrito otros polimorfismos de la IL10 que tienen la acción contraria, y limitan las reacciones inflamatorias al antagonizar las TNF-a, IL-1b, IL (393). Se han descrito 3 SNP en el gen promotor de IL-10 (_1082 G/A, _819 C/T, _592 C/A) que muestran un marcado desequilibrio de ligamiento, los cuales forman 3 haplotipos que se han asociado a un descenso en la síntesis de IL 10 y a diversas patologías (394). La IL-1 RA, antagoniza la actividad de IL-1 y controla la actividad del SNP del antagonista del receptor de IL-1b, y de IL-1 A (IL-1RA), habiéndose descrito la asociación a la predisposición a aterosclerosis e ictus (395-397). También se ha comunicado una mayor frecuencia del genotipo IL-1 VNTR 86 bp 2/2 en sujetos con IS lacunar (OR = 6.05; p = 0.017) (396). Otros genes que participan en los fenómenos inflamatorios también se han relacionado con el ictus, como el de la IL 6 y el de la metaloproteinasa 3 (MMP3) (398-401).

El gen BRCA-1 *associated protein* (BRAP) se ha identificado como relacionado con la susceptibilidad para el IAM (402). El poco frecuente SNP GG homocigoto rs11066001 en el gen BRAP se ha asociado en población japonesa y china con un incremento de a 1.31 a 1.47 veces el riesgo de IAM, con el índice tobillo-brazo y con la aterosclerosis carotídea (403, 404). El gen participa como mediador de la inflamación, y la translocación se ha relacionado con la producción citocinas inflamatorias aunque no hay datos concluyentes de su participación en la patogenia del ictus (405).

Polimorfismos del gen que codifica la linfotoxina-alfa (LTA) pueden aumentar la transcripción, asociarse a procesos inflamatorios crónicos y aumentar riesgo de IAM; en el ictus también se han asociado significativamente en sujetos no hipertensos: *LTA 252A_G* (modelo aditivo; OR, 1.4; 95% IC de 1.20 - 1.65; $P < 0.00002$) y *LTA 26Thr_Asn* (OR, 1.19 con 95% IC, 1.06- 1.34; $P = 0.003$). *LTA 252A_G* (406).

Diversos estudios han mostrado la herencia en los componentes de la coagulación y de los fenotipos de la fibrina en relación con la patogenia del ictus (407, 408). Muchas coagulopatías se heredan con un patrón autosómico dominante, y entre estas afecciones se incluyen las deficiencias de las proteínas C y S, las mutaciones del factor V Leiden (FVL) y otras deficiencias que aumentan el riesgo de trombosis venosas (409-413). Algunas coagulopatías adquiridas pueden ser familiares hasta en el 10 % de los casos (414, 415). Un estudio sugería que los estados de hipercogulabilidad eran más frecuentes en pacientes con FOP respecto a los que no lo tenían, sin encontrar diferencias en la prevalencia de FVL o de la mutación 20210 del gen de la protrombina. La prevalencia de la mutación 20210 de la protrombina aislada era mayor en sujetos con ictus criptogénico y FOP, lo que plantea que este mayor riesgo se relacione con el FOP (416).

El sistema de coagulación y fibrinólisis mantiene un equilibrio dinámico que en condiciones patológicas se altera sobrepasando los mecanismos regulatorios iniciando el proceso trombótico (417). Se ha demostrado herencia de fenotipos de la estructura de la fibrina y estudios GWAS han identificado loci genéticos comunes asociados con fenotipos de coagulación y se han asociado con EAC e ictus de vaso grande (408). De esta manera los factores

que puedan alterar este equilibrio pueden ejercer un papel en la aparición de la enfermedad vascular. La pérdida de la función fibrinolítica secundaria a la elevación del inhibidor del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1)) se ha relacionado con el IS. Los polimorfismos en el gen del PAI-1, como el polimorfismo promotor del alelo 4G conllevan niveles aumentados del activador tisular del plasminógeno (*tissue-type plasminogen activator* (tPA)), y se han implicado en la patogenia del ictus aunque su papel permanece controvertido (418, 419). El activador tisular del plasminógeno es un mediador primario de la fibrinólisis intravascular (420), un SNP -7351C/T se ha asociado con la tasa de liberación de TPA, y con el riesgo de IAM (421). Respecto a su asociación con el ictus hay datos contradictorios (422), por un lado se ha relacionado con el ictus lacunar (422), aunque un metanálisis plantea relación con el ictus de vaso grande en población caucásica (423). Se han descrito polimorfismos vinculados con el gen del TPA como el genotipo TT o un SNP en posición -7351 ligados al riesgo del IS (422, 424). El factor XII es una proteína plasmática miembro de las serin-proteasas con propiedades fibrinolíticas y que se ha asociado a eventos tromboticos aunque esta asociación es objeto de controversia (425-427). No obstante en diversos estudios el polimorfismo (sustitución 46 C a T) en la región 5 no traducida se ha asociado a una baja eficacia y variabilidad en los niveles de factor XII en la población general, y a ictus (428).

El factor VII es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado como zimógeno activo y participa en la cascada de la coagulación a través de la vía extrínseca, iniciándola (429, 430). Hay estudios que apoyan su influencia en la enfermedad cerebrovascular (ECV) (431). Los polimorfismos S670C y

IVS7 se han confirmado como FR independiente para la aparición de IS en sujetos jóvenes (432).

Se ha postulado en la patogenia del ictus asociado a historia familiar de migraña una contribución genética significativa (433-435). También se ha vinculado a los genes que codifican el sistema endotelial en la patogenia de estos trastornos (436-438), se ha encontrado una asociación entre endotelina-1 (EDN) e ictus y del receptor tipo B de la endotelina (EDNRB) B con 2 los polimorfismos htSNP (rs4885493 y rs10507875) en ictus en pacientes caucásicos (439); en este trabajo la asociación se corresponde con los subtipos de ictus cardioembólico y de origen indeterminado. El daño endotelial se ha sugerido en asociación con un componente genético como el mecanismo plausible para la asociación entre migraña y enfermedad vascular e ictus (440-442).

Enfermedades monogénicas e ictus

Hay otros trastornos genéticos monogénicos como la vasculopatía con depósitos electrodensos originada por mutaciones en el gen Notch3 y conocida como "*Cerebral Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*" (CADASIL) que se caracteriza por cefalea migrañosa, infartos subcorticales y demencia (443). Un trabajo reciente encontró un score poligénico asociado a las lesiones de sustancia blanca y sugieren que múltiples variantes con pequeño efecto cada una influyen en la carga de lesiones de sustancia blanca en los pacientes con CADASIL (444).

Los pacientes con "*Cerebral Autosomal-Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*" (CARASIL) son normotensos y

con alopecia precoz, tienen espondilosis entre la segunda y la tercera década y sufren ictus en la treintena, además de que desarrollan demencia antes de los 50 años. Los análisis de ligamiento han encontrado mutaciones en el gen HtrA serina proteasa 1 (HTRA1) y tienden a tener baja actividad de proteasa que es incapaz de limitar la señalización por la familia de factores transformadores del crecimiento factor- β (445).

Hay otras patologías hereditarias que pueden causar IS como la Enfermedad de Marfan (446), las neurofibromatosis 1 y 2 (447), o la enfermedad de Fabry (448). Las enfermedades del tejido conectivo como la de Marfan o el Ehlers Dahlos pueden estar relacionadas con las disecciones arteriales, que representan una causa frecuente de ictus en el paciente joven (449).

La enfermedad de Moyamoya es una vasculopatía progresiva no aterosclerótica con oclusión de las porciones terminales de arteria carótida interna. Se encuentra asociada a la anemia de células falciformes, la neurofibromatosis tipo 1 y a síndrome de Down (450). Estudios de ligamiento han mostrado mutaciones en heterocigosis en el gen alfa-actin (ACTA2) que puede se relaciona con la proliferación anormal de células musculares lisas y causar aneurismas y disecciones aórticas (TAAD), EAC prematura, IS y enfermedad de Moyamoya (451). También se ha identificado en pacientes con estenosis intracraneal sin datos clínicos Moyamoya un gen localizado en el cromosoma 17q (*ring finger protein 213* (RNF213) (452).

El IH ocurre con una incidencia de 15-19 casos por 100.000 habitantes y año(453), aunque ha sido menos estudiado en el IH también se ha demostrado

un papel causal para la herencia (454). En un análisis de genotipado GWAS en pacientes con IH el riesgo heredado fue 29% (SE, 11%) para loci no -APOE y 15% para APOE (SE, 10%). Para la mortalidad a 90 días en el grupo no APOE fue 41% y 10% para grupo APOE. (SE, 9%), además la herencia para el volumen del ictus en grupo no APOE fue del 60% (SE, 70%) y del 12% (SE, 4%) para grupo APOE (454). Este trabajo confirma los hallazgos previos de la prevalencia de los alelos $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ en los hematomas lobares respecto de los profundos (454). En un trabajo multicéntrico de los investigadores GOCHA (*Genetics of Cerebral Hemorrhage with Anticoagulation*) se analizaron polimorfismos de genes relacionados con la HTA y se desarrolló un score predictivo de riesgo encontrando asociación con el volumen del hematoma y el mal pronóstico funcional de los hematomas profundos y no de los lobares (280). De esta manera se confirma la idea que la carga de los genes relacionados con la HTA incrementa el riesgo de IH estableciendo una correlación con el grado de vasculopatía hipertensiva.

La trombosis venosa cerebral (TVC) es una forma poco frecuente de enfermedad vascular trombótica que representa el 1% del total de los ictus y que asocia una mortalidad del 10-13 % (455). En su patogenia se han implicados diversos factores etiológicos como embarazo (456, 457), la toma de ACO (458), el uso de fitoestrógenos (459), hipotensión intracraneal espontánea (460), enfermedad inflamatoria intestinal (461), quedando sin diagnosticar alrededor de un 15 % de los casos de TVC. Se ha demostrado relación con las trombofilias hereditarias en torno al 22 % (456), y en un metanálisis se ha demostrado asociación significativa con el FVL/G1691A (OR=2.40;95% CI,

1.75- 3.30; $P < 0.00001$), protrombina/G20210A (OR=5.48; 95% IC, 3.88- 7.74; $P < 0.00001$), MTHFR/C677T (OR=2.30; 95% IC, 1.20- 4.42; $P = 0.02$ (462).

Los aneurismas intracraneales caracterizan a ciertos trastornos Mendelianos como la poliquistosis renal, la displasia fibromuscular y el Ehlers-Dahlos tipo IV o vascular (463-465). Una colaboración europeo-japonesa en un estudio GWAS con replicación posterior encontró asociaciones entre los polimorfismos SOX17 (8q11.23–q12.1; OR, 1.28; $P = 1.3 \times 10^{-12}$) y CDKN2A-CDKN2B (9p21.3; OR, 1.31; $P = 1.5 \times 10^{-22}$). La relación de los aneurismas con el polimorfismo CDKN2BAS (.SOX17) se confirmó en un trabajo posterior de replicación (464). Estos tres loci fueron identificados: 18q11.2 (OR, 1.22; $P = 1.1 \times 10^{-12}$), STARD13-KL en 13q13.1 (OR 1.20; $P = 2.5 \times 10^{-9}$), y una región en el cromosoma 10 (10q24.32) (OR, 1.29; 1.2×10^{-9}), no obstante no está clara la asociación con la HSA (466). Otras asociaciones descritas y replicadas en parientes de sujetos con aneurismas intracraneales son en los cromosomas 4q31.23 (EDNRA), 10q24.32 (CNNM2), 12q22, 18q11.2 (RBBP8), y 20p12.1.3–6 (467-470).

Farmacogenómica

La farmacogenómica es un área que presenta aplicaciones prometedoras, las variaciones genéticas influyen el metabolismo de fármacos, su eficacia y los potenciales efectos adversos; de esta manera puede ser útil en desarrollo de nuevos fármacos (471). La Warfarina reduce el riesgo de ictus en pacientes con FANV y otras lesiones cardíacas con alto riesgo de cardioembolismo, para lo que se exige un control estricto del rango de anticoagulación que se analiza con el “*International Normalized Ratio*” (INR),

que tiene un rango estrecho para garantizar una adecuada protección anticoagulante y una baja tasa de efectos adversos hemorrágicos (472). Diversas variantes genéticas influyen en las variaciones del rango de anticoagulación, dos aloenzimas frecuentes CYP2C9 reducen la actividad enzimática y disminuyen los requerimientos de warfarina ya que la metabolización es más lenta (471). En este sentido tenemos la variabilidad genética en el citocromo P450 2C9 (CYP2C9), complejo 1 (VKORC1) óxido reductasa de la vitamina K y las mutaciones del propéptido factor IX que afectan a la sensibilidad de la vitamina K (473). Respalda esta aproximación los resultados de un estudio multicéntrico realizado en pacientes anticoagulados en los que la cohorte genotipada tuvo un 31 % menos de hospitalizaciones por sangrado o tromboembolismo (474). En 2010 la *Food and Drug Administration* (FDA) sugería que estos polimorfismos deberían ser tenidos en cuenta a la hora de la prescripción de anticoagulantes (475). Estudios GWAS han identificado que los pacientes que tomaban dabigatran y eran portadores de la mutación CES1rs2244613 tenían una menor disponibilidad del fármaco y riesgo de sangrado (476).

Los inhibidores de la Hidroximetilglutarato coenzima A reductasa (HMGCR) o estatinas se han confirmado como eficaces para el control de los niveles de riesgo vascular, además de que reducen el riesgo de enfermedad vascular y tienen efectos beneficiosos sobre la inflamación. No obstante su uso también se ve influido por variaciones individuales en la que participan mecanismos genéticos y ambientales (477, 478). Se han identificado variantes genéticas en HMGCR y ABCB1 (*ATP-binding cassette, sub-family B* (MDR/TAP) asociadas a una menor acción hipolipemiente (479). La más

potente interacción relacionada con el ictus corresponde al polimorfismo CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*) rs5883 (63), no obstante en este trabajo no se encontró relación entre las variantes estudiadas y la aparición de ictus o de infarto de miocardio. Estudios GWAS de pacientes tratados con 80 mg de simvastatina han identificado variantes frecuentes de SLCO1B1 asociadas con el desarrollo de miopatía (480). Por otra parte el uso de estatinas se ha observado que puede conferir un mayor riesgo de IH lobar en los sujetos que lleven la ApoE4/E4 y ApoE2/E4, lo que se ha confirmado en las cohortes de replicación (481).

El clopidogrel es un antiagregante que se emplea en la prevención de la enfermedad vascular (39), y se han descrito polimorfismos que modulan la activación metabólica del profármaco clopidogrel (CYP2C19) que conducen a un mayor riesgo de complicaciones vasculares en pacientes que lo emplean como prevención secundaria de la enfermedad vascular en los portadores de al menos de un alelo CYP2C19*2 (482, 483). También se han documentado variaciones en la respuesta antiagregante al clopidogrel en relación con genotipos PON Q192R, siendo esta respuesta inferior en los portadores de los alelos QR y RR respecto a los pacientes portadores de los alelos QQ (484).

El activador tisular del plasminógeno recombinante es el único tratamiento recanalizador arterial por vía intravenosa en la fase aguda del IS; su uso está condicionado por múltiples riesgos, especialmente por el riesgo de transformación hemorrágica del ictus (485). Se han descrito polimorfismos asociados a seguridad en el uso y se ha desarrollado un *score* para intentar predecir la respuesta y seguridad del tratamiento (486).

Justificación y objetivos

Justificación del trabajo

Diversos estudios epidemiológicos apoyan la relación entre el ictus como enfermedad de base multifactorial y factores genéticos que pueden predisponer a sufrirlo. Los avances en los estudios de asociación genómica (GWAS) están transformando el conocimiento de los factores genéticos relacionados con la patogenia del ictus, se están descubriendo nuevos genes implicados y estableciendo vínculos entre los distintos tipos de ictus y variantes genéticas en estos genes. De esta manera se podrá abrir la puerta a la obtención de nuevos tratamientos tanto por la identificación de estos genes y de sus productos, como por el descubrimiento de variantes nuevas o por aquellas ya caracterizadas que pueden tener un efecto fenotípico mensurable.

Las variantes genéticas descritas hasta el momento explican una parte del riesgo global de sufrir un ictus. De esta manera una predicción real del riesgo vascular dependerá de conocer un mayor número de variantes genéticas asociadas y así poder incorporarlas a los algoritmos predictivos. Es importante señalar que algunas de estas variantes se han asociado en estudios previos, realizados a pacientes con ictus específicamente con formas diferenciadas de presentación clínica. Por lo tanto su replicación es decir la confirmación de la asociación en diferentes poblaciones constituye un requisito indispensable para su validación y utilidad futuras.

Objetivos

Considerando la hipótesis que las variantes genéticas comunes en los genes paraoxonasa 1 y paraoxonasa 2, de la metilentetrahidrofolato reductasa y en el receptor 1 de la angiotensina-II se asociarían con el ictus isquémico en la población evaluada.

Para evaluar estas hipótesis nos hemos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la prevalencia de los polimorfismos descritos en nuestra población y la asociación con ictus isquémico.
2. Evaluación de la distribución de las frecuencias alélicas mediante un estudio de casos y controles (base poblacional del estudio PROCAGENE)
3. Correlacionar los distintos genotipos con los factores de riesgo y características fenotípicas en la población reclutada

Material y métodos

Material y métodos

Se diseñó un estudio de prospectivo de casos y controles, en el que incluiríamos a todos los pacientes consecutivos ingresados por un IS o por Ataque Isquémico Transitorio (AIT) en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín durante el periodo de estudio. La inclusión en el estudio de los pacientes estaba condicionada a la firma el consentimiento informado para participar en el mismo.

El estudio se puso en marcha sin financiación en enero de 2009. Nuestro objetivo inicial era recoger todos los pacientes ingresados en nuestra unidad durante un periodo de 6 meses. Para la estimación del tamaño de la muestra empleamos el software Quanto (<http://hydra.usc.edu/gxe/>).

Reclutamiento poblacional: Casos

Se definió el ictus como cualquier alteración neurológica focal de inicio brusco y duración mayor de 24 horas en las que las pruebas de neuroimagen descarten otro proceso causal (tumoral, infeccioso, inflamatorio o desmielinizante) o cualquier alteración neurológica focal en la que las pruebas de neuroimagen confirmen un evento isquémico o hemorrágico, independientemente de la duración.

Se definió el AIT como cualquier alteración neurológica focal de inicio brusco y duración menor de 24 horas en las que las pruebas de neuroimagen descarten otro proceso causal (tumoral, infeccioso, inflamatorio o desmielinizante) y además no muestren ninguna lesión isquémica compatible. La clasificación etiológica del IS se realizará según los criterios TOAST

revisados. Los IH se clasificaron conforme a la localización topográfica en lóbulos y en subcorticales.

En la visita basal recogimos los antecedentes personales de interés relacionados con la patología vascular HTA, DM, DLP, cardiopatía, EAP, hiperuricemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipotiroidismo, neoplasias previas...); los hábitos tóxicos (tabaco, alcohol, consumo de sustancias vasoactivas); los tratamientos que recibían previamente y el tratamiento recomendado al alta. Se clasificó el ictus según su subtipo etiológico. Se recogieron las variables TA al ingreso (sistólica y diastólica), la glucemia, los niveles de colesterol total, cLDL, cHDL y triglicéridos, las concentraciones de apolipoproteínas (AI y B), la microalbuminuria, la uricemia, la homocisteína, la vitamina B12, el ácido fólico, las hormonas tiroideas y el fibrinógeno. Además se realizó en los isquémicos un duplex de troncos supraaórticos para cuantificar la repercusión en términos de grados de estenosis, y en los casos en los que estuvo indicado se llevó a cabo un estudio angiográfico complementario, ya fuese con arteriografía convencional, con angio-TAC o resonancia magnética. En esta visita se extrajo una muestra de sangre venosa para el análisis de los distintos polimorfismos incluidos en el estudio.

Reclutamiento poblacional: Controles

Hemos utilizado la base de datos del estudio PROCAGENE para el reclutamiento de controles (487, 488). Para las variantes Paraoxonasa 1 (PON1) Gln192Arg y Leu55Met así como para la variante PON2 Cys311Ser el

número de controles disponibles genotipados en esta base de datos era de 562.

Extracción del DNA

Los métodos de extracción de DNA, en general, tienen una serie de pasos básicos que se cumplen independientemente del origen de la muestra. Estos son: disrupción celular (ruptura de la bicapa lipídica de las membranas celulares por tratamiento con detergentes, empleo de agentes quelantes que secuestran cationes estabilizantes de la membrana, etc.), seguido de eliminación de las proteínas (que constituyen los principales contaminantes del extracto), concentración del DNA (por precipitación con alcoholes), lavado (para eliminar restos de reactivos y solventes que puedan inhibir la Taq polimerasa) y resuspensión en presencia de bajas concentraciones de sales. Posteriormente se verifica un ligero aumento en la solubilidad de las proteínas (*salting-in*) por aumento de la fuerza iónica del medio respecto de soluciones acuosas. Por el otro lado, en presencia de altas concentraciones de sales, la solubilidad de las proteínas disminuye y terminan por precipitar.

El DNA fue extraído de leucocitos de sangre periférica utilizando el procedimiento que se describe a continuación, referenciado como "*Salting out procedure*" (489), con algunas modificaciones: 5 ml de sangre total en EDTA (tubo BD Vacutainer 15% 0,12ml) fueron congelados a -4°C para romper las células rojas. Posteriormente se descongeló la muestra y pasó a un tubo *Falcon* de 50 ml al que se le añadió 10 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Se centrifugó a 3000 rpm (Centrífuga Kubota 8800) durante 10 minutos, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet* en 10 ml de PBS para un segundo lavado. El *pellet* resultante se resuspendió en 5 ml de

DEB (10mM Trizma Base (*Tris[hydroxymethyl] aminoetano*), 150mM NaCl (*Sodium Chloride*) y de 3mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetate acid*) y se agitó en un vortex hasta que se disolvió perfectamente, para posteriormente añadirle 100µl de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) al 10%, mezclándolo sin agitar. Al tubo se le añadió 10 µl de RNasa (*RNase from Bovine Pancreas* 100 mg/ml) y se dejó en la estufa a 37°C durante 1 hora. Una vez transcurrido ese tiempo se añadió 100 µl de proteinasa K (*Proteinase K Lyophilized powder* 37 *units/mg*) y se mezcló sin agitar, incubando el resultado durante 1 hora a 56° C, mezclando por inversión cada 20 minutos y posteriormente a 37° C durante 12 horas.

A continuación se añadió al tubo *Falcon* 2 ml de C1Na 6M y se agitó fuertemente durante 1 minuto, pasando el resultado a ser centrifugado 30 minutos a 3000 rpm. Se desechó el *pellet* y el sobrenadante se transfirió a un tubo *Falcon* de 50 ml, añadiendo un volumen igual al que tenemos de isopropanol (2 isopropanol). Se agitó suavemente hasta concentrar el DNA en un filamento fino que se "pescó" y fue introducido en etanol al 80% para ser lavado durante 2 minutos. Posteriormente el filamento limpio se deja secar en un *Eppendorf* roscado abierto durante 12 horas, protegiendo la boca del tubo con parafina perforada. Una vez seco se resuspende el DNA en 100 µl de agua bidestilada y se pone en el agitador 12 horas. Posteriormente se tomó la dilución preparada y se llevó a una concentración final de 100 µg/ml, determinando la concentración de partida y su pureza mediante un espectrofotómetro Nanodrop.

Determinación de la variante C677T (rs1801133, g.14783C>T, pAla222Val) del gen MTHFR

La determinación del polimorfismo génico C677T del gen MTHFR, se realizó mediante digestión enzimática *Hinfl*. Se siguió el protocolo de Frosst y colaboradores con algunas variaciones (490). Para la amplificación por PCR se utilizaron los *primers* HM1 (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') y HM2 (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3') como primer *forward* (sentido) y primer *reverse* (anti sentido) respectivamente. Se amplificó un fragmento de 198bp, el cual se sometió al proceso de digestión enzimática *Hinfl* (*New England Biolabs*, UK). Se identificó el alelo 677T, por la presencia de un sitio *Hinfl*, resultando como consecuencia de la digestión dos fragmentos de 175 bp y 23 bp respectivamente. A diferencia, el alelo C en la posición 677 (677C) carece de sitio *Hinfl*. Los productos derivados de la PCR y de la digestión enzimática se analizaron en un gel de agarosa TBE al 3%. Se estableció la categoría de las muestras como homocigótica para la variante termolábil (677T), heterocigótica (C677T) o la tipo salvaje (677CC).

Determinación de los genotipos Gln192Arg (rs662, g21439A>G, pGln192Arg) y Met55Leu (rs854560 del gen PON1)

La determinación de los genotipos Gln192Arg y Met55Leu del gen PON1 se realizó utilizando PCR-RFLP según las técnica descrita por Humbert y cols (491), y por Shanguera y cols (492). La técnica radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por la PCR. Para la identificación del polimorfismo Gln192Arg se emplearon los *primers* de la PON 1^a (5'TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3') y de la PON 1B (5'CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'). En la tipificación del polimorfismo Met55Leu se utilizaron los *primers* de la PON1 55f (5`-GAA

GAGTGATGTATAGCCCCAG-3') y de la PON1 55 r (5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3').

Determinación del polimorfismo Ser311Cys del gen PON2.

Se utilizó el *primer sentido* PON2 F9 (5'-ACATGCATGTACGGTGGTCTTATA-3') y el primer *anti sentido* PON2 R9 (5'-AGCAATTCATAGATTAATTGTTA-3'), para amplificar la región del target del polimorfismo Cys311Ser del gen PON2. La amplificación por PCR del gen PON2, genera una ampliación de DNA de 262 bp. La digestión con la enzima de restricción *Ddel* genera en caso del alelo Cys dos bandas de 142 bp y 120 bp respectivamente, mientras que en el caso del alelo Ser, genera tres bandas de 120, 75 y 67 bp, respectivamente.

Variante A1166c (rs5186) del gen AGTR1

La determinación de los genotipos A1166C en la región 3'UTR del gen AT1R se realizó siguiendo el protocolo descrito por Nakauchi y cols (493). La amplificación con los *primers* AT1RH1 (5' TCC TCT GCA GCA CTT CAC TAC CAA ATG GGC 3') y AT1RH2 (5' TTC ATC GAG TTT CTG ACA TT 3') da lugar a un producto de 201 pb. El producto mutado (A1166C) genera fragmentos de 171 bp y de 30 bp al cortarlo con *HaeIII*. Los productos se revelaron mediante tinción con bromuro de etidio después del fraccionamiento electroforético a través de geles de agarosa.

Análisis de datos

Una vez obtenidos los datos se analizó la posible asociación de los diferentes polimorfismos con las siguientes variables:

- 1) La topografía lesional

- 2) Con los FR vascular.
- 3) Asociación con lesiones clínicas o asintomáticas en los estudios de neuroimagen

Estimación del poder estadístico

Para la evaluación del poder estadístico se empleó el software Quanto disponible en <http://hydra.usc.edu/gxe>.

Análisis de los datos demográficos, clínicos y genéticos

Para evaluar posibles diferencias entre casos y controles empleamos el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS, Inc.). La determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas se llevó a cabo con el programa genetics. Los haplotipos, contaje, inferencia y contraste con el programa haplo.stats y su visualización con haploview. Para los cálculos descritos se utilizaron además otros programas específicos como *Genetic Tools* y rCmdr. *Genetics*, *Genetic Tools*, *haplo.stats* y *haploview* se emplearon en entorno R.

Se analizaron comparando en cada grupo propuesto las frecuencias de los diferentes alelos con los controles apropiados de cada grupo y evaluando su significación estadística mediante la prueba de χ^2 , y el cálculo de los OR e intervalos de confianza según el método de Wolf-Haldane. Si alguno de los grupos en comparación resultó inferior a 5 individuos se aplicó el test exacto de Fischer. Se procedió a una normalización del modelo estadístico a fin de corregir las posibles distorsiones derivadas de las diferencias de edad de los sujetos de la muestra.

El equilibrio de Hardy Weinberg se comprobó utilizando las frecuencias genotípicas observadas frente a las esperadas y el test de χ^2 , con la corrección de Yates cuando resultó necesario.

Las variables cuantitativas se describen y representan gráficamente como valores medios \pm la desviación típica. Las variables cualitativas se representan y grafican como frecuencias absolutas y relativas y/o porcentajes. Evaluamos las desviaciones de la distribución normal mediante el estadístico Z de Kolmogorov-Smirnov. Realizamos las comparaciones de medias a través de la T de Student, para muestras independientes o las alternativas no paramétricas: la prueba de Wilcoxon y el test U de Mann-Whitney, cuando se consideró necesario. Ambas pruebas constituyen alternativas a la T de Student, bajo el supuesto de normalidad.

Las comparaciones entre pares para grupos relacionados, se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon o el test U de Mann-Whitney, para aquellas comparaciones a pares de grupos no relacionados. Estas pruebas no exigen ningún tipo de distribución a las variables y por ello no utilizan los valores obtenidos, ni ningún parámetro calculado con ellos, sino los rangos que se pueden establecer con estos valores.

Las comparaciones entre más de dos grupos, se evaluaron mediante el test de Kruskal-Wallis. La correlación entre variables continuas será determinada por la Rho (ρ) de Spearman. Las diferencias entre grupos, en función de las variables cualitativas se muestran en tablas de contingencia, realizando la prueba de Chi-cuadrado o la corrección exacta de Fisher cuando fue necesario.

Empleamos el análisis de regresión logística para identificar las correlaciones entre los genotipos y la presencia de enfermedad vascular o complicaciones lo que nos ha permitirá evaluar su influencia independiente de

otros factores conocidos. El nivel de significación se considerará para un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Resultados

1.-Descriptiva de la población

1.1.- Estimación del poder estadístico

La incidencia anual del ictus, está en torno a 175 por cien mil habitantes con una prevalencia de entre 50 o 60 casos por 10.000 habitantes entre 65 y 74 años y más de cien casos por 10.000 habitantes mayores de 65 años (494).

Para la evaluación del poder estadístico se empleó el software Quanto disponible en <http://hydra.usc.edu/gxe>. La evaluación más favorable, es decir aquella que requiere de un menor esfuerzo de reclutamiento considerando la prevalencia mayor, una única variante alélica y requiere que la frecuencia alélica sea ≥ 0.1 . A tal fin elegimos, de entre las analizadas, la variante Cys311Ser en el gen Paraxonasa 2 ($P_{Alelo\ S} = 0.798$). Para las variantes Paraxonasa 1 (PON1) Gln192Arg y Leu55Met y Cys311Ser el número de controles genotipados en relación al de casos reclutados es 2,63 de forma que elegimos un análisis de casos y controles no pareado con un valor $K_p = 0.006$ (incidencia global), bajo un modelo de herencia dominante y estableciendo un poder del 80%. El resto de parámetros se establecieron de acuerdo al ejemplo de utilización disponible en la documentación adjunta al programa. La salida del programa se muestra a continuación:

Outcome: Disease
 Design: Unmatched case-control (1:2.63)
 Hypothesis: Gene only
 Desired power: 0.700000
 Significance: 0.050000, 1-sided
 Gene
 Mode of inheritance: Dominant
 Allele frequency: 0.7980
 Disease model Summary parameters
 *P₀ 0.004666 k_p 0.006000
 R_G: 1.3000 (*indicates calculated value)

Parameter	Null	Full	Reduced
Gene	$\beta_G=0$	β_G	—

R _G	N		P ₀
	Gene		
1.3000	2767		0.004666
1.8000	655		0.003404
2.3000	372		0.002679
2.8000	270		0.002209

N is the number of cases required for the desired power
 The required number of controls is 2.63xN

La columna “Gene” refleja el número de pares casos-contróles necesarios y P₀ es el riesgo basal. Como puede observarse el valor “N” se aproxima al de casos reclutados en este estudio para un riesgo relativo alto.

Alternativamente puede utilizarse el análisis Quanto para determinar qué poder estadístico se alcanza, una vez conseguida una muestra de tamaño determinado. La variante elegida fue, por su frecuencia, Cys311Ser en el gen Paraxonasa 2 (P_{Alelo S}= 0.798), es decir se mantuvo la aproximación a efecto genético exclusivamente, se mantuvo así mismo la tasa de casos-contróles en 2.63. Basado en este análisis para un valor de N = 213, se obtuvo un poder estadístico de ~60% para detectar un riesgo relativo de 2.7 con un valor de significación del 0.05.

1.2.- Casos

1.3.- Emparejamiento por edad e sexo con la base de datos poblacional del Estudio PROCAGENE

Se reclutaron 216 pacientes de los que pudieron obtenerse datos genéticos y clínicos de 200 de ellos. En relación con la patología hemorrágica tuvimos que excluir los casos recogidos dado que la tasa de inclusión fue baja. También excluimos a los ictus en los que posteriormente se demostró una causa infrecuente (apartado 4 de la clasificación TOAST), como trombofilias hereditarias. La base de datos poblacional así obtenida se utilizó para emparejar por edad y por sexos con la base de datos poblacional PROCAGENE (488). El resultado del emparejamiento fue una pérdida del número de casos, fundamentalmente añosos, quedando constituida por grupos y sexos según la siguiente distribución:

Tabla de contingencia caso * Género

			Género		Total
			Hombre	Mujer	
caso	CASO	Recuento	98	31	129
		% de caso	76.0%	24.0%	100.0%
		% del total	32.1%	10.2%	42.3%
	CONTROL	Recuento	136	40	176
		% de caso	77.3%	22.7%	100.0%
		% del total	44.6%	13.1%	57.7%
Total	Recuento	234	71	305	
	% de caso	76.7%	23.3%	100.0%	
	% del total	76.7%	23.3%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.071 ^b	1	.790		
Corrección por continuidad	.017	1	.897		
Razón de verosimilitudes	.071	1	.790		
Estadístico exacto de Fisher				.786	.447
Asociación lineal por lineal	.071	1	.790		
N de casos válidos	305				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 30.03.

Como puede observarse no se hallaron diferencias significativas en la distribución de casos y controles por géneros.

1.4.- Comparación entre casos y controles: Prueba T

Las variables continuas compartidas entre la población de casos y la de controles fueron la edad, PAS (presión arterial sistólica), PAD (presión arterial diastólica), concentración de Ácido Fólico, Vitamina B₁₂, perfil lipídico (Colesterol total, LDL-Colesterol, HDL-Colesterol, Triglicéridos), concentración de Homocisteína plasmática total (tHcy) y Creatinina plasmática.

El contraste de valores medios de estas variables entre la población de casos y de controles obtenidos fue:

Estadísticos de grupo

caso	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	
EDAD	CASO	129	62.56	8.872	.781
	CONTROL	176	61.68	7.826	.590
TAS INGRESO	CASO	90	153.27	29.071	3.064
	CONTROL	176	146.15	26.124	1.969
TAD INGRESO	CASO	90	83.18	14.538	1.532
	CONTROL	176	87.26	11.907	.898
Fólico	CASO	119	8.790	3.7899	.3474
	CONTROL	81	6.157	1.9722	.2191
B12	CASO	118	455.396	249.0028	22.9226
	CONTROL	81	556.185	388.4404	43.1600
COLESTEROL TOTAL	CASO	128	175.08	41.770	3.692
	CONTROL	176	234.92	38.689	2.916
LDL	CASO	122	108.34	39.543	3.580
	CONTROL	176	153.03	34.878	2.629
HDL	CASO	122	42.28	15.006	1.359
	CONTROL	176	51.90	13.212	.996
TRIGLICERIDOS	CASO	125	151.38	81.833	7.319
	CONTROL	176	149.97	74.910	5.647
Homocisteína	CASO	106	16.142	7.3686	.7157
	CONTROL	174	17.805	7.7658	.5887
Creatinina	CASO	127	.8697	.28467	.02526
	CONTROL	176	.9193	.39362	.02967

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
EDAD	Se han asumido varianzas iguales	2.240	.136	.919	303	.359	.882	.960	-1.007	2.771
	No se han asumido varianzas iguales			.901	254.972	.368	.882	.979	-1.046	2.810
TAS INGRESO	Se han asumido varianzas iguales	.005	.942	2.022	264	.044	7.113	3.519	.185	14.042
	No se han asumido varianzas iguales			1.953	163.500	.053	7.113	3.642	-.079	14.306
TAD INGRESO	Se han asumido varianzas iguales	2.498	.115	-2.448	264	.015	-4.078	1.666	-7.358	-.798
	No se han asumido varianzas iguales			-2.296	151.466	.023	-4.078	1.776	-7.587	-.569
Fólico	Se han asumido varianzas iguales	19.411	.000	5.743	198	.000	2.6334	.4585	1.7292	3.5376
	No se han asumido varianzas iguales			6.411	186.928	.000	2.6334	.4108	1.8231	3.4437
B12	Se han asumido varianzas iguales	6.515	.011	-2.230	197	.027	-100.7894	45.1930	-189.9136	-11.6652
	No se han asumido varianzas iguales			-2.062	124.712	.041	-100.7894	48.8696	-197.5105	-4.0683
COLESTEROL TOTAL	Se han asumido varianzas iguales	2.825	.094	-12.874	302	.000	-59.842	4.648	-68.989	-50.695
	No se han asumido varianzas iguales			-12.719	261.142	.000	-59.842	4.705	-69.107	-50.578
LDL	Se han asumido varianzas iguales	4.549	.034	-10.293	296	.000	-44.693	4.342	-53.238	-36.149
	No se han asumido varianzas iguales			-10.062	238.696	.000	-44.693	4.442	-53.443	-35.944
HDL	Se han asumido varianzas iguales	.160	.689	-5.843	296	.000	-9.619	1.646	-12.859	-6.379
	No se han asumido varianzas iguales			-5.710	238.374	.000	-9.619	1.685	-12.937	-6.301
TRIGLICERIDOS	Se han asumido varianzas iguales	.339	.561	.154	299	.878	1.404	9.107	-16.517	19.326
	No se han asumido varianzas iguales			.152	252.217	.879	1.404	9.244	-16.801	19.610
Homocisteína	Se han asumido varianzas iguales	1.341	.248	-1.771	278	.078	-1.6623	.9387	-3.5101	.1854
	No se han asumido varianzas iguales			-1.794	230.983	.074	-1.6623	.9267	-3.4883	.1636
Creatinina	Se han asumido varianzas iguales	.091	.764	-1.211	301	.227	-.04963	.04100	-.13032	.03105
	No se han asumido varianzas iguales			-1.274	300.997	.204	-.04963	.03897	-.12631	.02705

1.5.- Comparación entre casos y controles: Prueba χ^2

Se contrastó mediante χ^2 la distribución de casos y controles para las siguientes categorías compartidas: HTA (presencia = 1, ausencia = 0), Diabetes (DM) (presencia = 1, ausencia = 0) y Tabaco (fumador y/o exfumador \leq 1 año = 1, no fumador y/o exfumador $>$ 1 año =2). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla de contingencia

			HTA		Total
			0	1	
caso	CASO	Recuento	49	79	128
		% de caso	38.3%	61.7%	100.0%
		% del total	16.1%	26.0%	42.1%
CONTROL	CONTROL	Recuento	100	76	176
		% de caso	56.8%	43.2%	100.0%
		% del total	32.9%	25.0%	57.9%
Total		Recuento	149	155	304
		% de caso	49.0%	51.0%	100.0%
		% del total	49.0%	51.0%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10.190 ^b	1	.001		
Corrección por continuidad	9.461	1	.002		
Razón de verosimilitudes	10.262	1	.001		
Estadístico exacto de Fisher				.002	.001
Asociación lineal por lineal	10.156	1	.001		
N de casos válidos	304				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 62.74.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.471	.296	.750
Para la cohorte HTA = 0	.674	.522	.869
Para la cohorte HTA = 1	1.429	1.150	1.777
N de casos válidos	304		

Tabla de contingencia

			DM		Total
			0	1	
caso	CASO	Recuento	77	52	129
		% de caso	59.7%	40.3%	100.0%
		% del total	25.2%	17.0%	42.3%
	CONTROL	Recuento	146	30	176
		% de caso	83.0%	17.0%	100.0%
		% del total	47.9%	9.8%	57.7%
Total	Recuento	223	82	305	
	% de caso	73.1%	26.9%	100.0%	
	% del total	73.1%	26.9%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20.496 ^b	1	.000		
Corrección por continuidad	19.330	1	.000		
Razón de verosimilitudes	20.408	1	.000		
Estadístico exacto de Fisher				.000	.000
Asociación lineal por lineal	20.429	1	.000		
N de casos válidos	305				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 34.68.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.304	.180	.516
Para la cohorte DM = 0	.720	.615	.842
Para la cohorte DM = 1	2.365	1.605	3.485
N de casos válidos	305		

Tabla de contingencia

			TABAQUISMO		Total
			1	2	
caso	CASO	Recuento	42	85	127
		% de caso	33.1%	66.9%	100.0%
		% del total	13.9%	28.1%	41.9%
	CONTROL	Recuento	43	133	176
		% de caso	24.4%	75.6%	100.0%
		% del total	14.2%	43.9%	58.1%
Total	Recuento	85	218	303	
	% de caso	28.1%	71.9%	100.0%	
	% del total	28.1%	71.9%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.728 ^b	1	.099		
Corrección por continuidad	2.317	1	.128		
Razón de verosimilitudes	2.709	1	.100		
Estadístico exacto de Fisher				.120	.064
Asociación lineal por lineal	2.719	1	.099		
N de casos válidos	303				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 35.63.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	1.528	.922	2.532
Para la cohorte TABAQUISMO = 1	1.354	.946	1.938
Para la cohorte TABAQUISMO = 2	.886	.764	1.027
N de casos válidos	303		

2.-Frecuencias alélicas y genotípicas (R):

2.1.-Variante MTHFR (C677T)

Number of samples typed: 302 (99%)

Allele Frequency: (2 alleles)

Count Proportion

C 376 0.62

T 228 0.38

NA 6 NA

Genotype Frequency:

Count Proportion

C/C 113 0.37

C/T 150 0.50

T/T 39 0.13

NA 3 NA

Heterozygosity (Hu) = 0.4707588

Poly. Inf. Content = 0.3595391

2.2.-Variante PON1 (Met55Leu)

Number of samples typed: 297 (97.4%)

Allele Frequency: (2 alleles)

Count Proportion

L 372 0.63

M 222 0.37

NA 16 NA

Genotype Frequency:

Count Proportion

L/L 109 0.37

L/M 154 0.52

M/M 34 0.11

NA 8 NA

Heterozygosity (Hu) = 0.4689049

Poly. Inf. Content = 0.3585494

2.3.-Variante PON1 (Gln192Arg)

Number of samples typed: 303 (99.3%)

Allele Frequency: (2 alleles)

Count Proportion

Q 428 0.71

R 178 0.29

NA 4 NA

Genotype Frequency:

Count Proportion

Q/Q 147 0.49

Q/R 134 0.44

R/R 22 0.07

NA 2 NA

Heterozygosity (Hu) = 0.4155906

Poly. Inf. Content = 0.3288318

2.4.-Variante PON2 (Cys311Ser)

Number of samples typed: 302 (99%)

Allele Frequency: (2 alleles)

Count Proportion

S 461 0.76

C 143 0.24

NA 6 NA

Genotype Frequency:

Count Proportion

S/S 184 0.61

S/C 93 0.31

C/C 25 0.08

NA 3 NA

Heterozygosity (Hu) = 0.3620034

Poly. Inf. Content = 0.2960976

2.5.-Variante AT1R (A1166C)

Number of samples typed: 303 (99.3%)

Allele Frequency: (2 alleles)

Count Proportion

A 434 0.72

C 172 0.28

NA 4 NA

Genotype Frequency:

Count Proportion

A/A 151 0.50

A/C 132 0.44

C/C 20 0.07

NA 2 NA

Heterozygosity (Hu) = 0.4072116

Poly. Inf. Content = 0.3239024

3.- Equilibrio Hardy-Wienberg (total de la población analizada, casos y controles (R))

3.1.- Variante MTHFR (C677T)

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 10000 replicates)

X-squared = 0.9754, df = NA, p-value = 0.3293

3.2.- Variante PON1 (Met55Leu)

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 10000 replicates)

X-squared = 3.4432, df = NA, p-value = 0.07989

3.3.- Variante PON1 (Gln192Arg)

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 10000 replicates)

X-squared = 1.3156, df = NA, p-value = 0.2727

3.4.- Variante PON2 (Cys311Ser)

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 1000 replicates)

X-squared = 6.6074, df = NA, p-value = 0.01499**

Para no diferir de lo esperado en Hardy-Weinberg (HWE) la población debe ser grande, estable y preferiblemente de tamaño infinito. En consecuencia en pequeñas poblaciones, los resultados del reclutamiento pueden producir errores de muestreo y consecuentemente alteraciones al azar en la frecuencia de los genotipos que modifican las frecuencias esperadas en HWE aun cuando la transmisión independiente de alelos se cumpla en la población del estudio. Alternativamente, estas desviaciones pueden originarse

como consecuencia de la inclusión de sujetos de diferentes grupos étnicos, podrían indicar errores sistemáticos de genotipificación (si bien en este caso lo más probable es detectar un exceso de heterocigotos) o bien pueden derivarse de la inclusión de sujetos control “hipernormales”.

3.5.- Variante AT1R (A1166C)

Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 10000 replicates)

X-squared = 1.5529, df = NA, p-value = 0.2575

4.- Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante

4.1.- Variante C667T: Genotipos

Tabla de contingencia

			C677T			Total
			CC	CT	TT	
caso	CASO	Recuento	45	64	19	128
		% de caso	35.2%	50.0%	14.8%	100.0%
		% del total	14.9%	21.2%	6.3%	42.4%
	CONTROL	Recuento	68	86	20	174
		% de caso	39.1%	49.4%	11.5%	100.0%
		% del total	22.5%	28.5%	6.6%	57.6%
Total	Recuento	113	150	39	302	
	% de caso	37.4%	49.7%	12.9%	100.0%	
	% del total	37.4%	49.7%	12.9%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.949 ^a	2	.622
Razón de verosimilitudes	.944	2	.624
Asociación lineal por lineal	.877	1	.349
N de casos válidos	302		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 16.53.

4.2.- Portador del alelo C677

Tabla de contingencia

			AleloC677		Total
			Alelo C	TT	
caso	CASO	Recuento	109	19	128
		% de caso	85.2%	14.8%	100.0%
		% del total	36.1%	6.3%	42.4%
CONTROL	CONTROL	Recuento	154	20	174
		% de caso	88.5%	11.5%	100.0%
		% del total	51.0%	6.6%	57.6%
Total		Recuento	263	39	302
		% de caso	87.1%	12.9%	100.0%
		% del total	87.1%	12.9%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.736 ^b	1	.391		
Corrección por continuidad	.468	1	.494		
Razón de verosimilitudes	.729	1	.393		
Estadístico exacto de Fisher				.392	.246
Asociación lineal por lineal	.733	1	.392		
N de casos válidos	302				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 16.53.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.745	.380	1.462
Para la cohorte AleloC677 = Alelo C	.962	.879	1.053
Para la cohorte AleloC677 = TT	1.291	.719	2.318
N de casos válidos	302		

4.3.- Portador del alelo T677

Tabla de contingencia

			AleloT677		Total
			CC	Alelo T	
caso	CASO	Recuento	45	83	128
		% de caso	35.2%	64.8%	100.0%
		% del total	14.9%	27.5%	42.4%
	CONTROL	Recuento	68	106	174
		% de caso	39.1%	60.9%	100.0%
		% del total	22.5%	35.1%	57.6%
Total	Recuento	113	189	302	
	% de caso	37.4%	62.6%	100.0%	
	% del total	37.4%	62.6%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.485 ^b	1	.486		
Corrección por continuidad	.332	1	.565		
Razón de verosimilitudes	.486	1	.486		
Estadístico exacto de Fisher				.548	.283
Asociación lineal por lineal	.483	1	.487		
N de casos válidos	302				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 47.89.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.845	.526	1.357
Para la cohorte AleloT677 = CC	.900	.667	1.214
Para la cohorte AleloT677 = Alelo T	1.064	.894	1.267
N de casos válidos	302		

5.-Variante C677T por sexos

5.1.- Genotipos C677T en hombres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia

			C677T			Total
			CC	CT	TT	
caso	CASO	Recuento	34	48	16	98
		% de caso	34.7%	49.0%	16.3%	100.0%
		% del total	14.7%	20.7%	6.9%	42.2%
	CONTROL	Recuento	54	62	18	134
		% de caso	40.3%	46.3%	13.4%	100.0%
		% del total	23.3%	26.7%	7.8%	57.8%
Total	Recuento	88	110	34	232	
	% de caso	37.9%	47.4%	14.7%	100.0%	
	% del total	37.9%	47.4%	14.7%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.880 ^a	2	.644
Razón de verosimilitudes	.881	2	.644
Asociación lineal por lineal	.863	1	.353
N de casos válidos	232		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 14.36.

5.2.- Genotipos C677T en mujeres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia

			C677T			Total
			CC	CT	TT	
caso	CASO	Recuento	11	16	3	30
		% de caso	36.7%	53.3%	10.0%	100.0%
		% del total	15.7%	22.9%	4.3%	42.9%
	CONTROL	Recuento	14	24	2	40
		% de caso	35.0%	60.0%	5.0%	100.0%
		% del total	20.0%	34.3%	2.9%	57.1%
Total	Recuento	25	40	5	70	
	% de caso	35.7%	57.1%	7.1%	100.0%	
	% del total	35.7%	57.1%	7.1%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.747 ^a	2	.688
Razón de verosimilitudes	.740	2	.691
Asociación lineal por lineal	.054	1	.816
N de casos válidos	70		

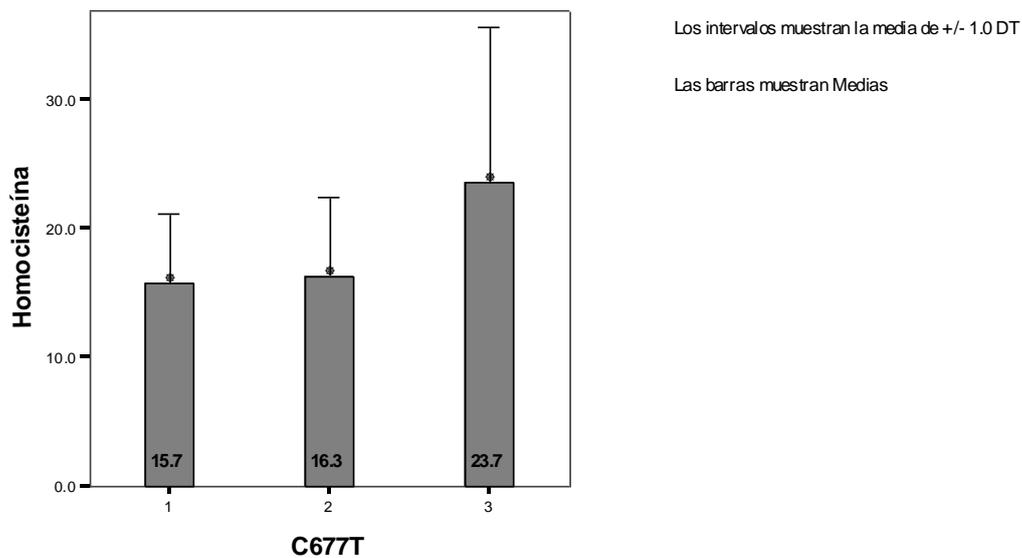
a. 2 casillas (33.3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2.14.

5.3.-Variante C677T: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles

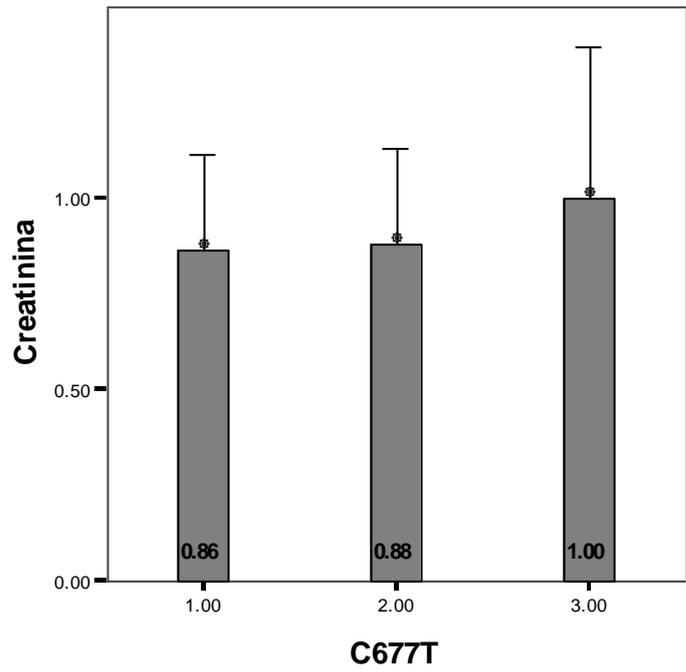
Se realizó un contraste de medias mediante el test ANOVA de un factor de acuerdo a los genotipos C677T con respecto a las siguientes variables continuas (aparecen subrayadas aquellas disponibles solo en casos): Edad, PAS, PAD, Hemoglobina glicada, Urea, Urato, Na²⁺, K⁺, Proteínas totales, CK, Calcio, Mg²⁺, Homocisteína, Fólico, Vitamina B12, Proteína C reactiva, Colesterol total, Colesterol LDL, Colesterol HDL, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína B, Creatinina, Microalbuminuria (mg/ml), T4L, TSH, Leucocitos, Hemoglobina, Plaquetas, Velocidad de Sedimentación Globular y Fibrinógeno.

Observamos diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a los genotipos C677T con respecto a la concentración de Homocisteína ($p < 0.0001$), Creatinina ($p = .023$) y Hb Glicada (sólo en casos) ($p = 0.037$). Se observó una gradación por genotipos para esta diferencia para los valores medios de homocisteína (también para los valores medios de vitamina B12 y ácido fólico pero en ambos casos sin alcanzar significación estadística) y para creatinina. Por el contrario la diferencia observada en casos respecto a Hb Glicada es no resultó en gradación por genotipos siendo probablemente espuria.

Gráficamente:



1:CC; 2:CT; 3:TT



Los intervalos muestran la media de +/- 1.0 D

Las barras muestran Medias

1:CC; 2:CT; 3:TT

Comparaciones múltiples

Bonferroni

Variable dependiente	(I) C677T	(J) C677T	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Hb GLICADA	CC	CT	.5237	.3086	.278	-0.228	1.275
		TT	-.4391	.4172	.885	-1.455	.577
	CT	CC	-.5237	.3086	.278	-1.275	.228
		TT	-.9627	.3970	.051	-1.929	.004
	TT	CC	.4391	.4172	.885	-.577	1.455
		CT	.9627	.3970	.051	-.004	1.929
Creatinina	CC	CT	-.01494	.03435	1.000	-.0976	.0678
		TT	-.13719*	.05106	.023	-.2601	-.0142
	CT	CC	.01494	.03435	1.000	-.0678	.0976
		TT	-.12225*	.04931	.041	-.2410	-.0035
	TT	CC	.13719*	.05106	.023	.0142	.2601
		CT	.12225*	.04931	.041	.0035	.2410
Fólico	CC	CT	-.1520	.5277	1.000	-1.426	1.122
		TT	-.1700	.7943	1.000	-2.088	1.748
	CT	CC	.1520	.5277	1.000	-1.122	1.426
		TT	-.0180	.7727	1.000	-1.884	1.848
	TT	CC	.1700	.7943	1.000	-1.748	2.088
		CT	.0180	.7727	1.000	-1.848	1.884
B12	CC	CT	-32.7425	48.8722	1.000	-150.765	85.280
		TT	7.8160	74.6998	1.000	-172.578	188.210
	CT	CC	32.7425	48.8722	1.000	-85.280	150.765
		TT	40.5585	72.7332	1.000	-135.086	216.203
	TT	CC	-7.8160	74.6998	1.000	-188.210	172.578
		CT	-40.5585	72.7332	1.000	-216.203	135.086
Homocisteína	CC	CT	-.6295	.9083	1.000	-2.817	1.558
		TT	-7.9497*	1.3350	.000	-11.165	-4.734
	CT	CC	.6295	.9083	1.000	-1.558	2.817
		TT	-7.3202*	1.2878	.000	-10.422	-4.218
	TT	CC	7.9497*	1.3350	.000	4.734	11.165
		CT	7.3202*	1.2878	.000	4.218	10.422

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

La diferencia en la concentración media de homocisteína se mantiene en casos ($p = 0.006$) y controles ($p < 0.0001$)

5.4.-Variante C677T: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión arterial y diabetes)

La evaluación de la distribución de genotipos C677T en función de las variables categóricas mostró diferencias significativas en el global de la

población analizada que se pierden por subgrupos no encontrándose cuando el análisis se efectúa en casos o en controles.

Tabla de contingencia

			C677T			Total
			CC	CT	TT	
DM	0	Recuento	75	120	25	220
		% de DM	34.1%	54.5%	11.4%	100.0%
		% del total	24.8%	39.7%	8.3%	72.8%
	1	Recuento	38	30	14	82
		% de DM	46.3%	36.6%	17.1%	100.0%
		% del total	12.6%	9.9%	4.6%	27.2%
Total	Recuento	113	150	39	302	
	% de DM	37.4%	49.7%	12.9%	100.0%	
	% del total	37.4%	49.7%	12.9%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7.783 ^a	2	.020
Razón de verosimilitudes	7.849	2	.020
Asociación lineal por lineal	.575	1	.448
N de casos válidos	302		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 10.59.

Diabetes y AleloC677

Tabla de contingencia

			AleloC677		Total
			Alelo C	TT	
DM	0	Recuento	195	25	220
		% de DM	88.6%	11.4%	100.0%
		% del total	64.6%	8.3%	72.8%
	1	Recuento	68	14	82
		% de DM	82.9%	17.1%	100.0%
		% del total	22.5%	4.6%	27.2%
Total		Recuento	263	39	302
		% de DM	87.1%	12.9%	100.0%
		% del total	87.1%	12.9%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.732 ^b	1	.188	.246	.132
Corrección por continuidad ^a	1.261	1	.261		
Razón de verosimilitudes	1.649	1	.199		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	1.726	1	.189		
N de casos válidos	302				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10.59.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para DM (0 / 1)	1.606	.789	3.267
Para la cohorte AleloC677 = Alelo C	1.069	.958	1.192
Para la cohorte AleloC677 = TT	.666	.364	1.217
N de casos válidos	302		

Diabetes y AleloT677

Tabla de contingencia

			AleloT677		Total
			CC	Alelo T	
DM	0	Recuento	75	145	220
		% de DM	34.1%	65.9%	100.0%
		% del total	24.8%	48.0%	72.8%
	1	Recuento	38	44	82
		% de DM	46.3%	53.7%	100.0%
		% del total	12.6%	14.6%	27.2%
Total		Recuento	113	189	302
		% de DM	37.4%	62.6%	100.0%
		% del total	37.4%	62.6%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.828 ^b	1	.050		
Corrección por continuidad	3.323	1	.068		
Razón de verosimilitudes	3.771	1	.052		
Estadístico exacto de Fisher				.061	.035
Asociación lineal por lineal	3.816	1	.051		
N de casos válidos	302				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 30.68.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para DM (0 / 1)	.599	.358	1.003
Para la cohorte AleloT677 = CC	.736	.547	.990
Para la cohorte AleloT677 = Alelo T	1.228	.983	1.534
N de casos válidos	302		

Tabaquismo y genotipos C677T

Tabla de contingencia

		C677T			Total
		CC	CT	TT	
TABAQUISMO 1	Recuento	29	36	17	82
	% de TABAQUISMO	35.4%	43.9%	20.7%	100.0%
	% del total	9.7%	12.0%	5.7%	27.3%
2	Recuento	84	113	21	218
	% de TABAQUISMO	38.5%	51.8%	9.6%	100.0%
	% del total	28.0%	37.7%	7.0%	72.7%
Total	Recuento	113	149	38	300
	% de TABAQUISMO	37.7%	49.7%	12.7%	100.0%
	% del total	37.7%	49.7%	12.7%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6.708 ^a	2	.035
Razón de verosimilitudes	6.188	2	.045
Asociación lineal por lineal	2.741	1	.098
N de casos válidos	300		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 10.39.

Tabaquismo y aleloC677

Tabla de contingencia

		AleloC677		Total
		Alelo C	TT	
TABAQUISMO 1	Recuento	65	17	82
	% de TABAQUISMO	79.3%	20.7%	100.0%
	% del total	21.7%	5.7%	27.3%
2	Recuento	197	21	218
	% de TABAQUISMO	90.4%	9.6%	100.0%
	% del total	65.7%	7.0%	72.7%
Total	Recuento	262	38	300
	% de TABAQUISMO	87.3%	12.7%	100.0%
	% del total	87.3%	12.7%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6.635 ^b	1	.010		
Corrección por continuidad	5.670	1	.017		
Razón de verosimilitudes	6.110	1	.013		
Estadístico exacto de Fisher				.018	.011
Asociación lineal por lineal	6.613	1	.010		
N de casos válidos	300				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10.39.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para TABAQUISMO (1 / 2)	.408	.203	.819
Para la cohorte AleloC677 = Alelo C	.877	.779	.988
Para la cohorte AleloC677 = TT	2.152	1.197	3.870
N de casos válidos	300		

Tabaquismo y AleloT677

Tabla de contingencia

		AleloT677		Total	
		CC	Alelo T		
TABAQUISMO	1	Recuento	29	53	82
		% de TABAQUISMO	35.4%	64.6%	100.0%
		% del total	9.7%	17.7%	27.3%
2	Recuento	84	134	218	
	% de TABAQUISMO	38.5%	61.5%	100.0%	
	% del total	28.0%	44.7%	72.7%	
Total	Recuento	113	187	300	
	% de TABAQUISMO	37.7%	62.3%	100.0%	
	% del total	37.7%	62.3%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.254 ^b	1	.614	.689	.357
Corrección por continuidad	.137	1	.711		
Razón de verosimilitudes	.256	1	.613		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	.254	1	.615		
N de casos válidos	300				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 30.89.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para TABAQUISMO (1 / 2)	.873	.515	1.481
Para la cohorte AleloT677 = CC	.918	.655	1.286
Para la cohorte AleloT677 = Alelo T	1.052	.868	1.273
N de casos válidos	300		

6.- Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante

6.1.-Variante PON1 (Met55Leu)

Tabla de contingencia

			Met55Leu			Total
			MM	LM	LL	
caso	CASO	Recuento	13	64	50	127
		% de caso	10.2%	50.4%	39.4%	100.0%
		% del total	4.4%	21.5%	16.8%	42.8%
	CONTROL	Recuento	21	90	59	170
		% de caso	12.4%	52.9%	34.7%	100.0%
		% del total	7.1%	30.3%	19.9%	57.2%
Total	Recuento	34	154	109	297	
	% de caso	11.4%	51.9%	36.7%	100.0%	
	% del total	11.4%	51.9%	36.7%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.806 ^a	2	.668
Razón de verosimilitudes	.807	2	.668
Asociación lineal por lineal	.798	1	.372
N de casos válidos	297		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 14.54.

6.2.- Alelo Met55 y riesgo

Tabla de contingencia

			AleloM55		Total
			Alelo M	LL	
caso	CASO	Recuento	77	50	127
		% de caso	60.6%	39.4%	100.0%
		% del total	25.9%	16.8%	42.8%
	CONTROL	Recuento	111	59	170
		% de caso	65.3%	34.7%	100.0%
		% del total	37.4%	19.9%	57.2%
Total	Recuento	188	109	297	
	% de caso	63.3%	36.7%	100.0%	
	% del total	63.3%	36.7%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.681 ^b	1	.409	.466	.241
Corrección por continuidad	.495	1	.482		
Razón de verosimilitudes	.679	1	.410		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	.678	1	.410		
N de casos válidos	297				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 46.61.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.819	.509	1.317
Para la cohorte AleloM55 = Alelo M	.929	.777	1.109
Para la cohorte AleloM55 = LL	1.134	.842	1.529
N de casos válidos	297		

6.3.-Alelo Leu55 y riesgo

Tabla de contingencia

			AleloL55		Total
			MM	Alelo L	
caso	CASO	Recuento	13	114	127
		% de caso	10.2%	89.8%	100.0%
		% del total	4.4%	38.4%	42.8%
	CONTROL	Recuento	21	149	170
		% de caso	12.4%	87.6%	100.0%
		% del total	7.1%	50.2%	57.2%
Total	Recuento	34	263	297	
	% de caso	11.4%	88.6%	100.0%	
	% del total	11.4%	88.6%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.321 ^b	1	.571		
Corrección por continuidad	.146	1	.702		
Razón de verosimilitudes	.324	1	.569		
Estadístico exacto de Fisher				.713	.353
Asociación lineal por lineal	.320	1	.571		
N de casos válidos	297				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 14.54.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.809	.389	1.685
Para la cohorte AleloL55 = MM	.829	.432	1.591
Para la cohorte AleloL55 = Alelo L	1.024	.944	1.111
N de casos válidos	297		

6.4.- Variante Met55Leu por sexos

6.5- Genotipos PON1 Met55Leu en hombres

No añadimos el valor del riesgo por alelos, ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas.

Tabla de contingencia

			Met55Leu			Total
			MM	LM	LL	
caso	CASO	Recuento	10	51	36	97
		% de caso	10.3%	52.6%	37.1%	100.0%
		% del total	4.4%	22.4%	15.8%	42.5%
	CONTROL	Recuento	15	74	42	131
		% de caso	11.5%	56.5%	32.1%	100.0%
		% del total	6.6%	32.5%	18.4%	57.5%
Total	Recuento	25	125	78	228	
	% de caso	11.0%	54.8%	34.2%	100.0%	
	% del total	11.0%	54.8%	34.2%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.638 ^a	2	.727
Razón de verosimilitudes	.636	2	.728
Asociación lineal por lineal	.535	1	.464
N de casos válidos	228		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 10.64.

6.6.- Genotipos Met55Leu en mujeres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia

			Met55Leu			Total
			MM	LM	LL	
caso	CASO	Recuento	3	13	14	30
		% de caso	10.0%	43.3%	46.7%	100.0%
		% del total	4.3%	18.8%	20.3%	43.5%
	CONTROL	Recuento	6	16	17	39
		% de caso	15.4%	41.0%	43.6%	100.0%
		% del total	8.7%	23.2%	24.6%	56.5%
Total	Recuento	9	29	31	69	
	% de caso	13.0%	42.0%	44.9%	100.0%	
	% del total	13.0%	42.0%	44.9%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.434 ^a	2	.805
Razón de verosimilitudes	.444	2	.801
Asociación lineal por lineal	.250	1	.617
N de casos válidos	69		

a. 1 casillas (16.7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 3.91.

6.7.- Variante Met55Leu: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles

Se realizó un contraste de medias mediante el test ANOVA de un factor de acuerdo a los genotipos PON 1 (Met55Leu) con respecto a las siguientes variables continuas (aparecen subrayadas aquellas disponibles solo en casos): Edad, PAS, PAD, Hemoglobina glicada, Urea, Urato, Na²⁺, K⁺, Proteínas totales, CK, Calcio, Mg²⁺, Homocisteína, Fólico, Vitamina B12, Proteína C reactiva, Colesterol total, Colesterol LDL, Colesterol HDL, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína B, Creatinina, Microalbuminuria (mg/ml), T4L, TSH, Leucocitos, Hemoglobina, Plaquetas, Velocidad de Sedimentación Globular y Fibrinógeno. No observamos diferencias significativas de acuerdo a los genotipos analizados en el total de la población analizada. No se observaron diferencias significativas en función de los genotipos tras categorizar por sexos. Se observaron diferencias significativas en la población de casos de acuerdo a valores medio de PAD ($p = 0.03$) y a la concentración media de fibrinógeno ($p = 0.005$) observándose, respecto a esta última, una gradación por genotipos.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
TAD INGRESO	Inter-grupos	1455.610	2	727.805	3.643	.030
	Intra-grupos	17179.941	86	199.767		
	Total	18635.551	88			
Fibrinógeno	Inter-grupos	39212.347	2	19606.174	5.671	.005
	Intra-grupos	290414.744	84	3457.318		
	Total	329627.091	86			

Pruebas post hoc

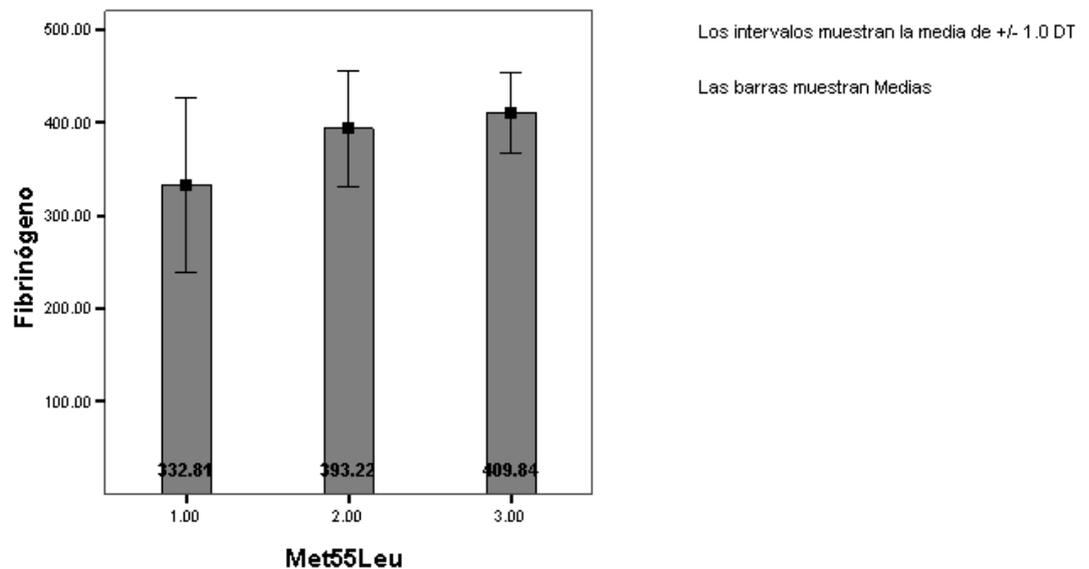
Comparaciones múltiples

Bonferroni

Variable dependiente	(I) Met55Leu	(J) Met55Leu	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
TAD INGRESO	MM	LM	-12.900*	4.787	.025	-24.59	-1.21
		LL	-10.702	4.869	.092	-22.59	1.19
	LM	MM	12.900*	4.787	.025	1.21	24.59
		LL	2.198	3.210	1.000	-5.64	10.04
	LL	MM	10.702	4.869	.092	-1.19	22.59
		LM	-2.198	3.210	1.000	-10.04	5.64
Fibrinógeno	MM	LM	-60.40577*	22.68219	.028	-115.8154	-4.9962
		LL	-77.02625*	22.92610	.004	-133.0317	-21.0208
	LM	MM	60.40577*	22.68219	.028	4.9962	115.8154
		LL	-16.62048	13.25738	.640	-49.0065	15.7655
	LL	MM	77.02625*	22.92610	.004	21.0208	133.0317
		LM	16.62048	13.25738	.640	-15.7655	49.0065

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Gráficamente



1:MM; 2:LM; 3:LL

6.8.- Variante Met55Leu: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)

La evaluación de la distribución de genotipos PON1 (Met55Leu) en función de las variables categóricas no mostró diferencias significativas en el global de la población analizada ni en el análisis por subgrupos de casos o controles.

7.- Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante

7.1.- Variante PON1 (Gln192Arg)

Tabla de contingencia

			RPN192			Total
			QQ	QR	RR	
caso	CASO	Recuento	63	62	4	129
		% de caso	48.8%	48.1%	3.1%	100.0%
		% del total	20.8%	20.5%	1.3%	42.6%
	CONTROL	Recuento	84	72	18	174
		% de caso	48.3%	41.4%	10.3%	100.0%
		% del total	27.7%	23.8%	5.9%	57.4%
Total	Recuento	147	134	22	303	
	% de caso	48.5%	44.2%	7.3%	100.0%	
	% del total	48.5%	44.2%	7.3%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6.107 ^a	2	.047
Razón de verosimilitudes	6.686	2	.035
Asociación lineal por lineal	1.161	1	.281
N de casos válidos	303		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 9.37.

7.2.- Alelo Gln192 (alelo Q) y riesgo

Tabla de contingencia

			AleloQ		Total
			Alelo Q	RR	
caso	CASO	Recuento	125	4	129
		% de caso	96.9%	3.1%	100.0%
		% del total	41.3%	1.3%	42.6%
	CONTROL	Recuento	156	18	174
		% de caso	89.7%	10.3%	100.0%
		% del total	51.5%	5.9%	57.4%
Total	Recuento	281	22	303	
	% de caso	92.7%	7.3%	100.0%	
	% del total	92.7%	7.3%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5.773 ^b	1	.016	.023	.012
Corrección por continuidad	4.747	1	.029		
Razón de verosimilitudes	6.355	1	.012		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	5.754	1	.016		
N de casos válidos	303				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9.37.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	3.606	1.190	10.927
Para la cohorte AleloQ = Alelo Q	1.081	1.019	1.147
Para la cohorte AleloQ = RR	.300	.104	.864
N de casos válidos	303		

7.3.- Alelo Arg192 (alelo R) y riesgo

Tabla de contingencia

			AleloR		Total
			QQ	Alelo R	
caso	CASO	Recuento	63	66	129
		% de caso	48.8%	51.2%	100.0%
		% del total	20.8%	21.8%	42.6%
	CONTROL	Recuento	84	90	174
		% de caso	48.3%	51.7%	100.0%
		% del total	27.7%	29.7%	57.4%
Total	Recuento	147	156	303	
	% de caso	48.5%	51.5%	100.0%	
	% del total	48.5%	51.5%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.009 ^b	1	.923	1.000	.508
Corrección por continuidad	.000	1	1.000		
Razón de verosimilitudes	.009	1	.923		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	.009	1	.923		
N de casos válidos	303				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 62.58.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	1.023	.648	1.613
Para la cohorte AleloR = QQ	1.012	.800	1.279
Para la cohorte AleloR = Alelo R	.989	.793	1.234
N de casos válidos	303		

7.4.- Variante PON1 (Gln192Arg) por sexos

7.5.- Genotipos Gln192Arg en hombres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia

			RPON192			Total
			QQ	QR	RR	
caso	CASO	Recuento	51	45	2	98
		% de caso	52.0%	45.9%	2.0%	100.0%
		% del total	22.0%	19.4%	.9%	42.2%
	CONTROL	Recuento	67	55	12	134
		% de caso	50.0%	41.0%	9.0%	100.0%
		% del total	28.9%	23.7%	5.2%	57.8%
Total	Recuento	118	100	14	232	
	% de caso	50.9%	43.1%	6.0%	100.0%	
	% del total	50.9%	43.1%	6.0%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4.843 ^a	2	.089
Razón de verosimilitudes	5.494	2	.064
Asociación lineal por lineal	1.228	1	.268
N de casos válidos	232		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 5.91.

7.6.- Genotipos Gln192Arg en mujeres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia

			RPN192			Total
			QQ	QR	RR	
caso	CASO	Recuento	12	17	2	31
		% de caso	38.7%	54.8%	6.5%	100.0%
		% del total	16.9%	23.9%	2.8%	43.7%
	CONTROL	Recuento	17	17	6	40
		% de caso	42.5%	42.5%	15.0%	100.0%
		% del total	23.9%	23.9%	8.5%	56.3%
Total	Recuento	29	34	8	71	
	% de caso	40.8%	47.9%	11.3%	100.0%	
	% del total	40.8%	47.9%	11.3%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.749 ^a	2	.417
Razón de verosimilitudes	1.815	2	.403
Asociación lineal por lineal	.090	1	.764
N de casos válidos	71		

a. 2 casillas (33.3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3.49.

7.7.- Variante Gln192Arg: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles.

Se realizó un contraste de medias mediante el test ANOVA de un factor de acuerdo a los genotipos PON1 (Gln192Arg) con respecto a las siguientes variables continuas (aparecen subrayadas aquellas disponibles solo en casos): Edad, PAS, PAD, Hemoglobina glicada, Urea, Urato, Na²⁺, K⁺, Proteínas totales, CK, Calcio, Mg²⁺, Homocisteína, Fólico, Vitamina B12, Proteína C

reactiva, Colesterol total, Colesterol LDL, Colesterol HDL, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína B, Creatinina, Microalbuminuria (mg/ml), T4L, TSH, Leucocitos, Hemoglobina, Plaquetas, Velocidad de Sedimentación Globular y Fibrinógeno. No observamos diferencias significativas de acuerdo a los genotipos analizados en el total de la población analizada. No se observaron diferencias significativas en función de los genotipos tras categorizar por sexos.

7.8.- Variante Gln192Arg: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes).

La evaluación de la distribución de genotipos PON1 (Gln192Arg) en función de las variables categóricas no mostró diferencias significativas en el global de la población analizada ni en el análisis por subgrupos de casos o controles.

7.9.- Haplotipos Paraoxonasa 1: Inferencia y Contraste (R)

Estimamos el valor D' , es decir el valor del desequilibrio de ligamiento entre las variantes PON1Gln192Arg y PON1 Met55Leu analizadas usando el programa “genetics” implementado en R ($D' = 0.79$ en el total de la población analizada, $D' = 0.8$ en controles y $D' = 0.75$ en controles)

De igual forma se implementó en R el programa haplo.stat a fin de evaluar la frecuencia poblacional de haplotipos e inferir su estima en dobles homocigóticos. El resultado en el total de la población se muestra a continuación:

Haplotipos: frecuencia en la población general, en casos y en controles

Counts per Grouping Variable Value

Grupos

1 2

128 172

Haplotype Frequencies By Group

	PON1(55)	PON1(192)	Total	Casos	Cotroles
1	L	Q	0.35229	0.39470	0.32140
2	L	R	0.26937	0.24592	0.28615
3	M	Q	0.35604	0.33577	0.37046
4	M	R	0.02229	0.02361	0.02199

Contraste de haplotipos inferidos entre casos y controles

Global Score Statistics

global-stat = 3.3167, df = 3, p-val = 0.34533

Counts for Cases and Controls

control	case
172	128

Haplotype Scores, p-values, Hap-Frequencies (hf), and Odds Ratios
(95% CI)

	pon55	pon192	Hap-Score	p-val	pool.hf	control.hf	case.hf	glm.eff	OR.lower	OR	OR.upper
2	L	R	-1.03915	0.298733	0.269376	0.286154	0.24592	Eff	0.60555	0.94229	1.4663
3	M	Q	-0.80036	0.423503	0.356042	0.370456	0.33577	Base	NA	1.00000	NA
4	M	R	-0.31484	0.752880	0.022291	0.021986	0.02361	Eff	0.26203	1.17534	5.2719
1	L	Q	1.79180	0.073165	0.352291	0.321405	0.39470	Eff	0.90293	1.36077	2.0507

Contraste de haplotipos inferidos entre casos y controles: modelo aditivo

Haplotype Effect Model: additive

Global Score Statistics

global-stat = 3.3167, df = 3, p-val = 0.34532

Haplotype-specific Scores

	pon55	pon192	Hap-Freq	Hap-Score	p-val
[1.]	L	R	0.26938	-1.03916	0.29873
[2.]	M	Q	0.35604	-0.80036	0.4235
[3.]	M	R	0.02229	-0.31484	0.75288
[4.]	L	Q	0.35229	1.7918	0.07316

8.- Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante

8.1.- Variante PON2 (Cys311Ser)

Tabla de contingencia

			Cys311Ser			Total
			CC	SC	SS	
caso	CASO	Recuento	17	34	77	128
		% de caso	13.3%	26.6%	60.2%	100.0%
		% del total	5.6%	11.3%	25.5%	42.4%
	CONTROL	Recuento	8	59	107	174
		% de caso	4.6%	33.9%	61.5%	100.0%
		% del total	2.6%	19.5%	35.4%	57.6%
Total	Recuento	25	93	184	302	
	% de caso	8.3%	30.8%	60.9%	100.0%	
	% del total	8.3%	30.8%	60.9%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8.031 ^a	2	.018
Razón de verosimilitudes	7.997	2	.018
Asociación lineal por lineal	1.779	1	.182
N de casos válidos	302		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 10.60.

8.2.- Alelo Cys311 y riesgo

Tabla de contingencia

			AleloC311		Total
			Alelo C311	SS	
caso	CASO	Recuento	51	77	128
		% de caso	39.8%	60.2%	100.0%
		% del total	16.9%	25.5%	42.4%
CONTROL	CONTROL	Recuento	67	107	174
		% de caso	38.5%	61.5%	100.0%
		% del total	22.2%	35.4%	57.6%
Total		Recuento	118	184	302
		% de caso	39.1%	60.9%	100.0%
		% del total	39.1%	60.9%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.055 ^b	1	.814		
Corrección por continuidad	.013	1	.908		
Razón de verosimilitudes	.055	1	.814		
Estadístico exacto de Fisher				.813	.453
Asociación lineal por lineal	.055	1	.814		
N de casos válidos	302				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 50.01.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	1.058	.663	1.688
Para la cohorte AleloC311 = Alelo C311	1.035	.779	1.374
Para la cohorte AleloC311 = SS	.978	.814	1.175
N de casos válidos	302		

8.3.- Alelo Ser311 y riesgo

Tabla de contingencia

			AleloSer311		Total
			CC	Alelo Ser311	
caso	CASO	Recuento	17	111	128
		% de caso	13.3%	86.7%	100.0%
		% del total	5.6%	36.8%	42.4%
	CONTROL	Recuento	8	166	174
		% de caso	4.6%	95.4%	100.0%
		% del total	2.6%	55.0%	57.6%
Total	Recuento	25	277	302	
	% de caso	8.3%	91.7%	100.0%	
	% del total	8.3%	91.7%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7.324 ^b	1	.007		
Corrección por continuidad	6.225	1	.013		
Razón de verosimilitudes	7.273	1	.007		
Estadístico exacto de Fisher				.010	.006
Asociación lineal por lineal	7.300	1	.007		
N de casos válidos	302				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10.60.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	3.178	1.326	7.616
Para la cohorte AleloSer311 = CC	2.889	1.287	6.485
Para la cohorte AleloSer311 = Alelo Ser311	.909	.843	.980
N de casos válidos	302		

8.4.- Variante PON2 (Cys311Ser) por sexos

8.5.- Genotipos Cys311 en hombres

Tabla de contingencia

			Cys311Ser			Total
			CC	SC	SS	
caso	CASO	Recuento	15	30	52	97
		% de caso	15.5%	30.9%	53.6%	100.0%
		% del total	6.5%	13.0%	22.5%	42.0%
	CONTROL	Recuento	7	46	81	134
		% de caso	5.2%	34.3%	60.4%	100.0%
		% del total	3.0%	19.9%	35.1%	58.0%
Total	Recuento	22	76	133	231	
	% de caso	9.5%	32.9%	57.6%	100.0%	
	% del total	9.5%	32.9%	57.6%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6.850 ^a	2	.033
Razón de verosimilitudes	6.793	2	.033
Asociación lineal por lineal	3.714	1	.054
N de casos válidos	231		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 9.24.

Tabla de contingencia

			AleloC311		Total
			Alelo C311	SS	
caso	CASO	Recuento	45	52	97
		% de caso	46.4%	53.6%	100.0%
		% del total	19.5%	22.5%	42.0%
	CONTROL	Recuento	53	81	134
		% de caso	39.6%	60.4%	100.0%
		% del total	22.9%	35.1%	58.0%
Total	Recuento	98	133	231	
	% de caso	42.4%	57.6%	100.0%	
	% del total	42.4%	57.6%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.078 ^b	1	.299		
Corrección por continuidad	.816	1	.366		
Razón de verosimilitudes	1.076	1	.300		
Estadístico exacto de Fisher				.346	.183
Asociación lineal por lineal	1.073	1	.300		
N de casos válidos	231				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 41.15.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	1.323	.780	2.243
Para la cohorte AleloC311 = Alelo C311	1.173	.870	1.582
Para la cohorte AleloC311 = SS	.887	.704	1.117
N de casos válidos	231		

Tabla de contingencia

			AleloSer311		Total
			CC	Alelo Ser311	
caso	CASO	Recuento	15	82	97
		% de caso	15.5%	84.5%	100.0%
		% del total	6.5%	35.5%	42.0%
CONTROL	CONTROL	Recuento	7	127	134
		% de caso	5.2%	94.8%	100.0%
		% del total	3.0%	55.0%	58.0%
Total	Total	Recuento	22	209	231
		% de caso	9.5%	90.5%	100.0%
		% del total	9.5%	90.5%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6.847 ^b	1	.009		
Corrección por continuidad	5.711	1	.017		
Razón de verosimilitudes	6.790	1	.009		
Estadístico exacto de Fisher				.012	.009
Asociación lineal por lineal	6.818	1	.009		
N de casos válidos	231				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9.24.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	3.319	1.298	8.489
Para la cohorte AleloSer311 = CC	2.960	1.255	6.983
Para la cohorte AleloSer311 = Alelo Ser311	.892	.812	.980
N de casos válidos	231		

8.6.- Genotipos Ser311 en mujeres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia

			Cys311Ser			Total
			CC	SC	SS	
caso	CASO	Recuento	2	4	25	31
		% de caso	6.5%	12.9%	80.6%	100.0%
		% del total	2.8%	5.6%	35.2%	43.7%
	CONTROL	Recuento	1	13	26	40
		% de caso	2.5%	32.5%	65.0%	100.0%
		% del total	1.4%	18.3%	36.6%	56.3%
Total	Recuento	3	17	51	71	
	% de caso	4.2%	23.9%	71.8%	100.0%	
	% del total	4.2%	23.9%	71.8%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4.042 ^a	2	.133
Razón de verosimilitudes	4.232	2	.120
Asociación lineal por lineal	.776	1	.378
N de casos válidos	71		

a. 2 casillas (33.3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1.31.

8.7.- Variante Cys311Ser: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles

Se realizó un contraste de medias mediante el test ANOVA de un factor de acuerdo a los genotipos PON2 (Cys311Ser) con respecto a las siguientes variables continuas (aparecen subrayadas aquellas disponibles solo en casos): Edad, PAS, PAD, Hemoglobina glicada, Urea, Urato, Na²⁺, K⁺, Proteínas totales, CK, Calcio, Mg²⁺, Homocisteína, Fólico, Vitamina B12, Proteína C reactiva, Colesterol total, Colesterol LDL, Colesterol HDL, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína B, Creatinina, Microalbuminuria (mg/ml), T4L, TSH, Leucocitos, Hemoglobina, Plaquetas, Velocidad de Sedimentación Globular y Fibrinógeno.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a los genotipos Cys311Ser.

8.8.- Variante Cys311Ser: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)

La evaluación de la distribución de genotipos PON2 (Cys311Ser) en función de las variables categóricas tabaco e hipertensión no mostró diferencias significativas en el global de la población analizada ni en el análisis por subgrupos de casos o controles. La homocigosis Cys311Cys asoció con un riesgo significativo de diabetes que se perdió en el análisis por grupos.

9.- Tablas de contingencia y riesgo en análisis univariante

9.1.- Variante AT1R (A1166C)

Tabla de contingencia caso * A1166C

			A1166C			Total
			AA	AC	CC	
caso	CASO	Recuento	63	58	8	129
		% de caso	48.8%	45.0%	6.2%	100.0%
		% del total	20.8%	19.1%	2.6%	42.6%
	CONTROL	Recuento	88	74	12	174
		% de caso	50.6%	42.5%	6.9%	100.0%
		% del total	29.0%	24.4%	4.0%	57.4%
Total	Recuento	151	132	20	303	
	% de caso	49.8%	43.6%	6.6%	100.0%	
	% del total	49.8%	43.6%	6.6%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.200 ^a	2	.905
Razón de verosimilitudes	.200	2	.905
Asociación lineal por lineal	.021	1	.884
N de casos válidos	303		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8.51.

9.2.- Alelos 1166C y riesgo

Tabla de contingencia caso * AleloC1166

			AleloC1166		Total
			AA	AleloC	
caso	CASO	Recuento	63	66	129
		% de caso	48.8%	51.2%	100.0%
		% del total	20.8%	21.8%	42.6%
	CONTROL	Recuento	88	86	174
		% de caso	50.6%	49.4%	100.0%
		% del total	29.0%	28.4%	57.4%
Total	Recuento	151	152	303	
	% de caso	49.8%	50.2%	100.0%	
	% del total	49.8%	50.2%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.089 ^b	1	.765	.817	.427
Corrección por continuidad	.033	1	.855		
Razón de verosimilitudes	.089	1	.765		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	.089	1	.765		
N de casos válidos	303				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 64.29.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO / CONTROL)	.933	.592	1.471
Para la cohorte AleloC1166 = AA	.966	.767	1.215
Para la cohorte AleloC1166 = AleloC	1.035	.826	1.297
N de casos válidos	303		

9.3.- Alelo A1166 y riesgo

Tabla de contingencia caso * AleloA1166

			AleloA1166		Total
			Alelo A	CC	
caso	CASO	Recuento	121	8	129
		% de caso	93.8%	6.2%	100.0%
		% del total	39.9%	2.6%	42.6%
CONTROL	CONTROL	Recuento	162	12	174
		% de caso	93.1%	6.9%	100.0%
		% del total	53.5%	4.0%	57.4%
Total	Total	Recuento	283	20	303
		% de caso	93.4%	6.6%	100.0%
		% del total	93.4%	6.6%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.058 ^b	1	.810		
Corrección por continuidad	.000	1	.994		
Razón de verosimilitudes	.058	1	.809		
Estadístico exacto de Fisher				1.000	.501
Asociación lineal por lineal	.058	1	.810		
N de casos válidos	303				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8.51.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para caso (CASO/ CONTROL)	1.120	.444	2.826
Para la cohorte AleloA1166 = Alelo A	1.007	.949	1.070
Para la cohorte AleloA1166 = CC	.899	.379	2.136
N de casos válidos	303		

9.4.- Variante AT1R (A1166C) por sexos

9.5.- Genotipos A1166C en hombres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia caso * A1166C

			A1166C			Total
			AA	AC	CC	
caso	CASO	Recuento	47	47	4	98
		% de caso	48.0%	48.0%	4.1%	100.0%
		% del total	20.3%	20.3%	1.7%	42.2%
CONTROL	CONTROL	Recuento	67	57	10	134
		% de caso	50.0%	42.5%	7.5%	100.0%
		% del total	28.9%	24.6%	4.3%	57.8%
Total	Total	Recuento	114	104	14	232
		% de caso	49.1%	44.8%	6.0%	100.0%
		% del total	49.1%	44.8%	6.0%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.491 ^a	2	.474
Razón de verosimilitudes	1.538	2	.464
Asociación lineal por lineal	.028	1	.868
N de casos válidos	232		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 5.91.

9.6.- Genotipos A166C en mujeres

No se especifica el valor del riesgo por alelos ya que el análisis no resultó en diferencias estadísticamente significativas:

Tabla de contingencia caso * A1166C

			A1166C			Total
			AA	AC	CC	
caso	CASO	Recuento	16	11	4	31
		% de caso	51.6%	35.5%	12.9%	100.0%
		% del total	22.5%	15.5%	5.6%	43.7%
	CONTROL	Recuento	21	17	2	40
		% de caso	52.5%	42.5%	5.0%	100.0%
		% del total	29.6%	23.9%	2.8%	56.3%
Total	Recuento	37	28	6	71	
	% de caso	52.1%	39.4%	8.5%	100.0%	
	% del total	52.1%	39.4%	8.5%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.511 ^a	2	.470
Razón de verosimilitudes	1.509	2	.470
Asociación lineal por lineal	.321	1	.571
N de casos válidos	71		

a. 2 casillas (33.3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 2.62.

9.7.- Variante A1166C: Relación con variables cuantitativas en el total de la población analizada, en casos y en controles

Se realizó un contraste de medias mediante el test ANOVA de un factor de acuerdo a los genotipos C677T con respecto a las siguientes variables continuas (aparecen subrayadas aquellas disponibles solo en casos): Edad, PAS, PAD, Hemoglobina glicada, Urea, Urato, Na²⁺, K⁺, Proteínas totales, CK, Calcio, Mg²⁺, Homocisteína, Fólico, Vitamina B12, Proteína C reactiva, Colesterol total, Colesterol LDL, Colesterol HDL, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína B, Creatinina, Microalbuminuria (mg/ml), T4L, TSH, Leucocitos, Hemoglobina, Plaquetas, Velocidad de Sedimentación Globular y Fibrinógeno. No observamos diferencias significativas de acuerdo a los genotipos analizados en el total de la población analizada. No se observaron diferencias significativas en función de los genotipos tras categorizar por sexos.

9.8.- Variante A166C: Relación con variables categóricas (consumo de tabaco, hipertensión y diabetes)

La evaluación de la distribución de genotipos AT1R (A1166C) en función de las variables categóricas tabaco e hipertensión no mostró diferencias significativas en el global de la población analizada ni en el análisis por subgrupos de casos o controles. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de genotipos respecto a la diabetes que se perdió en el análisis por grupos.

10.- Análisis de regresión logística binaria multivariante

Para evaluar la capacidad de predicción de la variable independiente “ictus isquémico” (caso versus control), se realizaron diversos análisis de

regresión logística múltiple. El objetivo principal de este trabajo fue replicar asociaciones genéticas con SNPs de los genes candidato MTHFR, PON1, PON2 y AT1R. Por tanto, tratamos de determinar la relevancia de las asociaciones caracterizadas en nuestra población en análisis univariante mediante análisis multivariante utilizando inicialmente el método introducir. Éste, se constituye en el método adecuado cuando el objetivo del estudio es el ajuste de variables de confusión y la exploración de términos de interacción.

Evaluamos además si los coeficientes fueron significativos para su inclusión o eliminación del modelo aplicando el test de Hosmer–Lemeshow. Todas las variables categóricas fueron transformadas en variables dummy, tomando el valor 1 para la presencia de la característica y 0 por su ausencia. Se consideró la introducción de genotipos para modelos de herencia dominante/recesivo. Se introdujeron en el modelo genotipos, las variables categóricas HTA, tabaco y diabetes y las variables continuas compartidas entre casos y controles. Estas fueron la edad, PAS, PAD, concentración de Ácido Fólico, Vitamina B12, perfil lipídico (Colesterol total, LDL-Colesterol, HDL-Colesterol, Triglicéridos), concentración de Homocisteína plasmática total (tHcy) y Creatinina plasmática. No obstante, es importante señalar que el contraste univariante de las medias entre variables continuas mostró diferencias significativas de forma tal que los casos se caracterizaron por menores concentraciones plasmáticas medias de HDL, Vitamina B₁₂ y mayores valores medios de triglicéridos así como valores superiores de presión arterial sistólica. Sin embargo algunas de las diferencias observadas muestran, paradójicamente, cifras superiores en los controles respecto a los casos. Así, el colesterol total, los valores de LDL, creatinina y tHcy resultaron

significativamente superiores en controles respecto a los casos. No obstante todas las variables continuas se introdujeron en el modelo con independencia de si diferían o no en análisis univariante.

Resumen de casos incluidos y excluidos:

Tabla de clasificación^{a,b}

Observado			Pronosticado		
			caso		Porcentaje correcto
			CASO	CONTROL	
Paso 0	caso	CASO	0	65	.0
		CONTROL	0	73	100.0
Porcentaje global					52.9

a. En el modelo se incluye una constante.

b. El valor de corte es .500

Prueba Omnibus: Muestra una prueba Chi Cuadrado (χ^2) que evalúa la hipótesis nula de que los coeficientes

(β) de todos los términos (excepto la constante) incluidos en el modelo son cero.

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo

		Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	139.250	18	.000
	Bloque	139.250	18	.000
	Modelo	139.250	18	.000

Verosimilitud:

Resumen de los modelos

Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	51.595 ^a	.635	.848

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 8 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de .001.

El valor de -2 log de la verosimilitud inicial es: 190.845

Bondad de ajuste: Prueba de Hosmer-Lemeshow. La prueba evalúa si las tasas de eventos observados coinciden con las tasas de eventos previstos en los subgrupos de la población modelo.

Prueba de Hosmer y Lemeshow

Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	103.758	8	.000

Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow

		caso = CASO		caso = CONTROL		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso	1	14	14.000	0	.000	14
1	2	14	13.981	0	.019	14
	3	14	13.696	0	.304	14
	4	14	12.043	0	1.957	14
	5	6	7.816	8	6.184	14
	6	2	2.761	12	11.239	14
	7	0	.613	14	13.387	14
	8	0	.080	14	13.920	14
	9	1	.010	13	13.990	14
	10	0	.000	12	12.000	12

Sensibilidad y Especificidad del modelo

Tabla de clasificación^a

Observado		Pronosticado			
		caso		Porcentaje correcto	
		CASO	CONTROL		
Paso 1	caso	CASO	61	4	93.8
		CONTROL	5	68	93.2
Porcentaje global					93.5

a. El valor de corte es .500

Riesgos

Variables en la ecuación

		B	E. T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95.0% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1	HTA(1)	1.625	.940	2.986	1	.084	5.078	.804	32.078
	TABAQUISMO(1)	-4.229	1.313	10.381	1	.001	.015	.001	.191
	DM(1)	-.721	.979	.542	1	.462	.486	.071	3.313
	rsexo(1)	2.507	1.147	4.780	1	.029	12.272	1.296	116.166
	TADINGRESO	.046	.042	1.220	1	.269	1.047	.965	1.137
	Fólico	-1.197	.313	14.646	1	.000	.302	.164	.558
	B12	.005	.002	3.685	1	.055	1.005	1.000	1.009
	COLESTEROLTOTAL	.147	.071	4.294	1	.038	1.158	1.008	1.331
	LDL	-.095	.069	1.887	1	.170	.909	.794	1.041
	HDL	.069	.079	.766	1	.382	1.072	.918	1.252
	TRIGLICERIDOS	-.014	.014	1.012	1	.314	.986	.960	1.013
	AleloC311(1)	-2.400	1.185	4.099	1	.043	.091	.009	.926
	AleloL55(1)	-2.363	1.481	2.545	1	.111	.094	.005	1.717
	AleloR(1)	-.085	.858	.010	1	.921	.919	.171	4.940
	EDAD	-.104	.052	3.964	1	.046	.901	.814	.998
	AleloT677(1)	.432	.944	.209	1	.647	1.540	.242	9.791
	Homocisteína	-.118	.050	5.681	1	.017	.888	.806	.979
rA1166(1)	.640	1.961	.107	1	.744	1.897	.041	88.586	
Constante	-7.947	6.529	1.482	1	.224	.000			

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: HTA, TABAQUISMO, DM, rsexo, TADINGRESO, Fólico, B12, COLESTEROLTOTAL, LDL, HDL, TRIGLICERIDOS, AleloC311, AleloL55, AleloR, EDAD, AleloT677, Homocisteína, rA1166.

El tabaco, el género masculino, la edad, la concentración de ácido fólico y de homocisteína plasmática total, la concentración de colesterol total y el genotipo “portador del alelo Cys311 de la variante PON2 (Cys31Ser)” se constituyen en predictivas en el modelo ajustado.

Discusión

Discusión

La enfermedad vascular a cualquier nivel tiene una gran importancia dado que conlleva una alta morbilidad y mortalidad (4). El ictus constituye la segunda causa de muerte y la primera discapacidad (5, 6, 22); además de acarrear unos importantes costes sociales y personales (24).

La enfermedad vascular arterial cerebral (EVC) tiene un origen complejo al igual que ocurre con la enfermedad arterial en otros lechos del organismo, solapándose con frecuencia con la afectación a otros nivel; y ocurre que con frecuencia no se explica únicamente por los factores de riesgo tradicionales (39). En la patogenia de la ECV intervienen diversas interacciones entre los factores de riesgo ambientales y los genéticos (39, 495). La enfermedad vascular arterial a cualquier nivel aumenta su prevalencia con la edad y con la adición de los factores de riesgo clásicos (496). No obstante también puede ocurrir en ausencia de estos, lo que apoya el papel patogénico de los factores genéticos (61).

Hay tres métodos principales que permiten una aproximación a la genética del ictus, en primer lugar tenemos análisis de ligamiento en el que se estudian múltiples variantes genéticas en muchas generaciones familiares. Estos análisis son útiles en trastornos mendelianos en enfermedades monogénicas, cuando el riesgo que confieren los genes en cuestión es alto y son menos útiles en enfermedades poligénicas. Otro método consiste en buscar en genes candidatos, las variantes genéticas, generalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), para posteriormente evaluar diferencias en su frecuencia en los estudios de casos-control. La selección de los genes suele hacerse partiendo del conocimiento de la patogenia de la

enfermedad y de las posibles funciones en las que pudiese estar implicado cada gen. Este método tiene limitaciones y dificultades para replicar los hallazgos y solo sirve para SNPs ya descritos. El origen de los fallos en estos estudios puede deberse a no contar con una muestra suficiente, a la imposibilidad de replicar los hallazgos, la incapacidad para clasificar por subtipos etiológicos, en el fenotipado o un fallo para establecer la asociación por subtipos. Finalmente disponemos de los estudios de asociación a genoma completo (GWAS) para el genotipado total del genoma de un individuo valorando múltiples SNPs. Una vez que se lleva a cabo un estudio GWAS es necesario realizar un estudio de casos control o de cohortes comparando la frecuencia de los SNPs individuales en ambos grupos.

Todos estos tipos de estudio presentan sus ventajas e inconvenientes. Así en GWA y dada la heterogeneidad del ictus su efectividad ha sido menor estando lastrada generalmente por los problemas derivados del tamaño muestral y de los posibles errores en el genotipado. Los estudios de casos-control también se asocian a sesgos por ejemplo en aquellos casos en lo que la enfermedad aumenta el riesgo de muerte precoz y las muestras se tomen únicamente de supervivientes vivos, los de cohortes obvian este sesgo aunque la disponibilidad de casos es limitada. Una alternativa es genotipar a más de un miembro de la familia y emplear un método de análisis de base familiar, que también presenta limitaciones en el caso del ictus, si bien se han identificado algunas asociaciones robustas con el IS. En este sentido un avance es la aparición de colaboraciones multicéntricas como la *Metastroke Collaboration* o la “*Stroke Genetics Network (SiGN)*”.

Los progresos en el estudio de la genética asociada al ictus han mejorado la comprensión de la enfermedad vascular arterial y abren la puerta a nuevos hallazgos en relación con los genes implicados en la patogenia de la misma y en aspectos como el relativo a la farmacogenómica.

El propósito de este estudio ha sido analizar la frecuencia y su contraste de ciertos polimorfismos ya previamente descritos y asociados al ictus en nuestro medio. Nuestro objetivo recalca la importancia de replicar los trabajos de asociación genética. También nos planteamos analizar un polimorfismo menos estudiado como el A166C del gen del receptor 1 de la angiotensina-II (AT1R) dada la relevancia de este sistema en la regulación de la homeostasis circulatoria y la asociación descrita con enfermedad vascular.

Para el reclutamiento de los casos se escogió una población hospitalaria de enfermos diagnosticados de enfermedad vascular, ya sea como AIT o ictus isquémico. Se trataba de casos consecutivos que hubiesen otorgado el consentimiento informado para su inclusión en el estudio.

Las variables recogidas fueron el sexo y la edad, origen urbano o rural, la presencia o no de factores de riesgo vascular y los estudios diagnósticos llevados a cabo. Pudimos reclutar un total de 216 casos, de los cuales tenían estudio completo incluido genotipado 200 de ellos. No obstante decidimos incluir únicamente 129 (98 hombres y 31 mujeres), para poder emparejar por edad y sexo (*“matcheado”*) con los 176 controles elegidos (136 hombres y 40 mujeres). El resultado del emparejamiento significó una pérdida de los casos añosos. Por otro lado se excluyeron todos los ictus no isquémicos. La población control era una cohorte histórica que se reclutó en este hospital para el estudio “Procagene” (488). Esta cohorte de controles incluía sujetos sin

evidencias clínicas de enfermedad vascular en la que se incluyeron datos sociodemográficos, presencia de factores de riesgo y el estudio genético de las variables que nos ocupan. En estos controles el efecto de “estructura poblacional” (mezcla de poblaciones) ya se había analizado con anterioridad (497). Señalar que en ellos no existían diferencias relevantes en la frecuencia de genotipos, ni en las características clínicas o bioquímicas entre el total de casos reclutados y los que finalmente se dejamos para el análisis de casos y controles tras ajustar por edad.

El contraste mediante la *t* de *Student* de variables continuas muestra una población de casos con diferencias significativas en la evaluación de factores de riesgo clásicos (PAS; PAD, Hcy entre otras) así mismo el contraste mediante χ^2 la distribución de casos y controles para las variables categóricas en las siguientes categorías compartidas: HTA (presencia = 1, ausencia = 0), Diabetes (DM) (presencia = 1, ausencia = 0) y tabaco (fumador y/o exfumador ≤ 1 año = 1, no fumador y/o ex-fumador > 1 año =2) no mostró diferencias significativas. La distribución de diabéticos e hipertensos resultó superior en casos respecto a controles.

Polimorfismos de la Metilentetrahidrofolato Reductasa

La enzima Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) participa en la síntesis de 5-metil tetrahidrofolato (FH_4), a partir de 5,10 metilen tetrahidrofolato. El 5 metil-tetrahidrofolato es la forma predominante de folato circulante y el principal donante de grupos metilo en la vía de la remetilación. Un defecto en esta enzima ocasiona la acumulación de homocisteína (Hcy), dado que se limita que la homocisteína metil transferasa, a través de la ruta de

remetilación, transfiera un grupo metilo a la Hcy y así transformarla en metionina (498).

El gen de la MTHFR se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3). Goyette y colaboradores describieron inicialmente dos mutaciones en el gen que codifica para la MTHFR, en la primera se produce una sustitución de citosina por timina en la posición 559 del gen (499). De esta manera se elimina uno de los dos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción FOPI. La segunda mutación ocurre en el gen que codifica para la MTHFR, consiste en una transición de una guanina por adenina en la posición 482 del gen, que produce el cambio de una arginina por una glutamina. Esta mutación conduce a la creación de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción PstI (499). El mismo grupo identificó otras siete mutaciones relacionadas (500).

Frosst y colaboradores en 1995, identificaron una nueva mutación causada por la sustitución de una citosina por una timina en la posición 667 del gen (C677T), lo que ocasiona el cambio de una alanina por una valina en la secuencia aminoacídica en la posición 233, originando una variante termolábil de la MTHFR, que conllevaba reducción de hasta un 50% de la actividad de la enzima (490). Van der Put y colaboradores en 1998 comunicaron otra mutación en el gen que codifica para la MTHFR, que cambia una adenina por una citosina en la posición 1298 (A1298C). Observaron que la combinación heterocigota de ambas mutaciones (C677T+A1298C) reduce de manera significativa la actividad de la MTHFR en comparación con cada una de las formas heterocigotas de las dos alteraciones de manera individual (501). En un estudio realizado en Rumania en el que se analizaban ambos polimorfismos no

se demostró relación con el IS, por el contrario sí que hubo una mayor incidencia de IH en el grupo control donde era más prevalente el polimorfismo C677T (502).

Kang y colaboradores (1991) encontraron que la mutación C677T estaba presente en el 17% de los pacientes con enfermedades cardíacas y en el 5% de los controles (503). Además mostraron una correlación entre la deficiencia de la enzima y el riesgo a desarrollar EAC, ya que en la mayoría de los pacientes con la alteración que provoca una proteína termolábil poseían altos niveles de homocisteína (503). Aunque hay datos contradictorios, hay trabajos en los que el suplemento con vitamina B₁₂ disminuye el riesgo de ictus en sujetos de alto riesgo (504, 505), lo que apoyaría su papel en la patogenia de la patología vascular. En este sentido hay trabajos que postulan el beneficio de la riboflavina en pacientes hipertensos que son portadores del polimorfismo C677T (506),

Se han realizado diversos estudios GWAS de los niveles de Hcy con resultados variables; y se han postulado diversas regiones de ligamiento en los cromosomas 1q42, 9q34, 11q23, 12q24, 13q, 14q32, 16q y 1913 (507, 508). Además se han descrito otros polimorfismos asociado a incremento de los niveles de Hcy como metiltransferasa 2756A3G, MTRR 66A3G, cSHMT 1420C3T, TC 67A3G, TC 776C3G, y GCPII 1561C3T (509). Por otro lado hay trabajos en los que se postula el efecto acumulativo de diversas variantes de los genes implicados en el metabolismo de la homocisteína, con bajo o moderado riesgo cada una, pueden jugar un papel en el riesgo de IS (510).

La Cistationina Beta-Sintasa (CBS) produce cistationina a partir de cisteína y serina por la vía de la transulfuración. El gen de la CBS se encuentra

en el brazo largo del cromosoma 21 en la posición q22.3 (511). Entre las mutaciones más frecuentes están la que provoca el cambio de una isoleucina por triptófano en la posición 278 y la que provoca un cambio de glicina por serina en la posición 307. Se ha descrito la mutación G1330A, que genera una transición de una guanina por una adenina, provocando un cambio de ácido aspártico por asparragina (D444N), lo que afecta el dominio regulatorio de la proteína CBS (512). Boers et al, 1985 encontraron que una alta frecuencia de heterocigocidad para la deficiencia en esta enzima predispone al desarrollo de enfermedad arterial oclusiva prematura (513), se considera que los polimorfismos de la CBS están menos relacionados con la enfermedad vascular que aquellos de la MTHFR.

Existen varios factores que determinan una elevación de los niveles de homocisteína, en primer lugar nutricionales dado que puede deberse una a ingesta baja de vitaminas B6, B12 y ácido fólico; también pueden guardar relación con un síndrome de mala absorción y con el consumo de alcohol (514). Los niveles de homocisteína aumentan con la edad y son mayores en hombres, en parte en relación a la masa muscular y la síntesis de creatinina/creatina y en parte en relación con las concentraciones de vitaminas y hormonas. Diversos fármacos pueden incrementar también las concentraciones de homocisteína, como el metotrexato, fenitoína e hipolipemiantes. Finalmente están las causas que se relacionan con defectos en los genes de las enzimas que catalizan la degradación de la metionina y la homocisteína, o de enzimas que sintetizan cofactores necesarios para ello (515).

Durante la autoxidación de la homocisteína se generan como productos derivados, potentes especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el anión hidroxilo. Estas ROS pueden provocar disfunción de endotelio, con el consiguiente daño de la pared vascular, alteración vasomotora, activación y agregación plaquetaria, activación de elastasa, depósito intimal de calcio, peroxidación de lípidos, proliferación de células musculares lisas (516), y además disminuye la disponibilidad de óxido nítrico (517). El resultado es un aumento en la aterogénesis y facilitar fenómenos trombóticos (498). Un ejemplo es el trabajo de cuantificación de la ateromatosis del arco aórtico en el que la hiperhomocistenemia es un factor de riesgo independiente de la progresión de la misma (518).

En nuestra serie se realizó el estudio del polimorfismo C677T de la MTHFR y se analizó la prevalencia de los alelos, de esta manera encontramos que era mayor la prevalencia del alelo C, 376 frente a 228 T, así como del genotipo C/T, 150 seguido de 113 C/C y por último 39 TT. No observamos diferencias respecto a lo esperado de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg para ninguna de las poblaciones analizadas. La estimación del riesgo asociado para el alelo-C no resultó significativa, no encontrándose diferencias en función del sexo.

Diversos estudios prospectivos y de casos y controles que la elevación de los niveles de Hcy en plasma es un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular, para las trombosis venosas (502), y arteriales, incluyendo el ictus (519, 520). El metanálisis de 22 estudios publicado en 2004 mostró una odds ratio (OR) 1.24 (IC 1.08 a 1.42) al tener un genotipo CC comparado con el TT(519). Otro metanálisis con 2034 casos demostró una asociación

significativa del polimorfismo MTHFR C677T con el riesgo de IH bajo el modelo dominante (OR,1.61; 95% IC, 1.3 a 1.9) y en el recesivo (OR, 1.6, 95% IC, 1.4 a 2.0) (521). Un metanálisis posterior con 2.223 casos demostró una asociación significativa con el IS para el polimorfismo del alelo T [OR=1.28, 95% (95% IC): 1.17-1.40, P<0.00001] y una asociación marginal con el genotipo CT (OR=1.13, 95% IC: 1.01-1.27, P=0.04) y el TT (OR=1.43, 95% IC: 1.20-1.70, P<0.001) (522).

Por otra parte también se han descrito interacciones entre SNP de la MTHFR y factores ambientales, asociándose a síndrome metabólico (523), además se ha descrito efecto sinérgico en el aumento del riesgo de IS con la mutación 20210 del gen de la protrombina (524).

En nuestra serie la relación documentada entre genotipos y niveles de Hcy sí fue detectada, sin embargo el riesgo no se demostró lo que probablemente se justifica por la reducción de casos en aras del emparejamiento que hemos descrito. Es importante señalar que en un análisis multivariante no incluido en los resultados se incluyeron las variables Hcy, genotipos C677 portador y la interacción entre ambas variantes sin obtener significación estadística.

Polimorfismos de paraoxonasa 1

El sistema de las paraoxonasas (PON) comprende 3 genes que comparten 60-65% de similitud en los aminoácidos (315), que se localizan en el cromosoma 7 (7q21.3–22) y codifican 3 isoenzimas las cuales participan en prevenir la oxidación de los lípidos. Los polimorfismos genéticos asociados a las PON afectan a la actividad de la enzima y se han asociado a un incremento en el riesgo de IS, aunque con datos controvertidos (316, 317). Los niveles

aumentados de PON1 se han asociado en algunos estudios con mayores niveles de HDL (323, 525), que poseen la mayor capacidad predictiva negativa para enfermedad vascular. No obstante en estudios realizados en EAC se ha planteado un mayor valor pronóstico en relación con la actividad de arilesterasa, que mide la función de la PON 1, respecto a la medida de la PON 1 (324), y en este sentido postulan una capacidad predictiva alta para identificar sujetos de alto riesgo en una cohorte de prevención primaria.

El gen de la PON 1 se ha investigado como potencial factor de riesgo para fenotipos relacionados con la aterosclerosis, incluyendo la EAC, EAP e IS (326, 328). La actividad de la enzima y la frecuencia de los alelos varían de forma amplia, de esta manera la inconsistencia de los estudios de asociación con la enfermedad vascular se podrían explicar por la variabilidad genotípica. La actividad de la PON 1 depende de diversos factores, entre los que se encuentran factores genéticos, edad, sexo, estilo de vida y fármacos (324). La actividad de PON1 disminuye con la edad, además puede estar ligada a circunstancias en las que está incrementado el estrés oxidativo como puede ser la aterosclerosis (526). En relación con el efecto del alcohol hay datos controvertidos, aunque se ha evidenciado un incremento en la actividad de la PON relacionado con el consumo moderado en hombres de mediana edad y mujeres postmenopáusicas (527, 528). También diversas entidades se han asociado a menor actividad de la PON1 como son la diabetes (529), hipertiroidismo (530), artritis reumatoide (531), insuficiencia renal crónica (532) o las demencias de Alzheimer y vascular (533) . La actividad de la PON1 está reducida en los pacientes con infarto agudo de miocardio, e hipercolesterolemia (534).

En nuestra serie se genotipó la variante PON1 (Met55Leu) y se analizó la prevalencia de los alelos, resultando un total de 372 L y de 222 M; respecto a la frecuencia de los genotipos obtuvimos 154 L/M y 109 L/L y 39 M/M. No observamos diferencias respecto a lo esperado de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg para ninguna de las poblaciones analizadas. No observamos diferencias significativas de acuerdo a los genotipos analizados en el total de la población analizada, tampoco se demostraron diferencias significativas en función de los genotipos tras categorizar por sexos. Se observaron diferencias significativas en la población de casos de acuerdo a valores medios de PAD ($p = 0.03$) y a la concentración media de fibrinógeno ($p = 0.005$) observándose, respecto a esta última, una gradación por genotipos. Existen varios mecanismos descritos que justificarían la asociación observada con la PAD. La enzima paraoxonasa 1 posee actividad antioxidante y se ha caracterizado como una tiolactona hidrolasa. Diversos estudios vinculan ambas capacidades con el alelo de riesgo L55 de la variante Met55Leu. En el estudio de la variante PON1 (Gln192Arg) documentamos una mayor frecuencia del alelo Q (428 respecto a 178 R) y del genotipo Q/Q (147 respecto a 134 QR). En el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg no hallamos diferencias respecto a lo esperado. La distribución de genotipos resultó en diferencias significativas. Paradójicamente detectamos un riesgo significativo 3.606 (IC 95%: 1.190-10.927) asociado al alelo Q, riesgo que se justifica debido a la mayor frecuencia de heterocigotos QR en los casos. En el análisis del riesgo en función del sexo de la variante Gln192Arg no se documentaron diferencias estadísticamente significativas. La evaluación de la distribución de genotipos PON1 (Gln192Arg) en función de las variables categóricas no mostró

diferencias significativas en el global de la población analizada ni en el análisis por subgrupos de casos o controles.

La mayoría de los estudios analizan 1 o 2 polimorfismos de la PON 1, hay un trabajo con 187 pacientes con hipercolesterolemia familiar que hace un análisis amplio de los polimorfismos, Q192R y L55M en la región codificante, además de T-107C, C-126G, G-162A, G-824A, y C-907G SNPs en la región promotora de la PON1 (327). De esta manera estudiaron combinaciones de haplotipos de la PON1 en relación con la enfermedad vascular. Demostraron que 2 haplotipos discordantes tenían hasta un 22% de diferencias en relación con el GIM, lo que apoyaría la base genética (327).

Se ha demostrado la influencia en la actividad de la PON 1 de estos polimorfismos (Gln/Arg en posición 192 y sustitución Leu/Met en posición 55) (491). Estos polimorfismos se han asociado a ictus en pacientes jóvenes y en ancianos respectivamente (535, 536). Se ha sugerido que la presencia de estos alelos en individuos simultáneamente expuestos a otros factores como la diabetes o el tabaco, que también incrementan el estrés oxidativo pueden potenciar el riesgo vascular (537, 538). En un trabajo de Lazaros que analizó la relación de polimorfismos de las paraoxonasas (PON1 (Q/R) 192, PON1 (M/L) 55, y PON2 (Cys311Met) con la gravedad del ictus no encontró diferencias significativas, salvo en el caso de la PON2 (S/C) 311), y así se sugería su posible papel predisponente a sufrir ictus grave (346). Otro trabajo de Pasdar en población caucásica en el que se incluyó el análisis de PON1(Met 55Leu) tampoco observó el papel de los polimorfismos de genes paraoxonasa individuales en la patogenia del ictus isquémico (337). También se subrayó la importancia de utilizar un programa de análisis de haplotipos bien validados y

que los resultados de las diferencias de haplotipos deberían ser confirmados en estudios a gran escala. Tampoco se encontró asociación en un trabajo de Voescht en población joven con ictus (535). En el estudio “*Austrian Stroke Prevention*” el genotipo 55 LL se asoció a progresión de lesiones de sustancia blanca (539), y a la frecuencia y gravedad de estenosis carotídea (540).

Bonafé y colaboradores examinaron el polimorfismo Q192R en 308 centenarios italianos no relacionados y 579 individuos italianos de edades comprendidas entre 20 y 65 años (541). El porcentaje de portadores del alelo R192 fue significativamente mayor en los centenarios que en las personas jóvenes (0,539 vs 0,447, $p = 0,011$). No se observó ninguna diferencia significativa entre los centenarios y los individuos jóvenes para el polimorfismo PON1 L55M (168820.0002). Los autores proponen que el alelo R192 disminuye la mortalidad en los portadores, pero que el efecto de la variabilidad PON1 sobre la mortalidad general de la población es escaso. Los resultados sugirieron que la PON1 es uno de los genes que afectan a la capacidad de adaptación individual y por lo tanto es uno de los genes que afectan la velocidad y la calidad del envejecimiento.

En un estudio longitudinal de la supervivencia que incluyó 1.932 individuos daneses, Christiansen encontró que las mujeres homocigotas para el alelo R192 tuvieron una tasa de supervivencia menor en comparación con los homocigotos Q192 (razón de riesgo, 1,38; $p = 0,04$) (542). Una muestra independiente de 541 individuos daneses confirmó los hallazgos para R192 mujeres homocigotas, con un OR de 1,38 ($p = 0,09$). La combinación de las 2 muestras no cambió la estimación del riesgo, pero aumentó la significación estadística ($p = 0,008$). Utilizando los datos de auto-reporte de la enfermedad

isquémica del corazón, los autores sólo encontraron una tendencia no significativa de la homocigosis R192 en las mujeres a constituir un factor de riesgo. Los investigadores concluyeron que la homocigosis R192 de la PON1 se asocia con una mayor mortalidad en las mujeres en la segunda mitad de la vida y que este aumento de la mortalidad tiene una posible relación con la gravedad y la supervivencia de las enfermedades del corazón, en lugar de la susceptibilidad al desarrollo de las mismas.

PON1 Gln192Arg asocia un incremento del riesgo de ictus en el análisis univariante, pero se produce un efecto de riesgo asociado al alelo Q. Este efecto no es real en el sentido de que el riesgo sea del alelo Q lo que ocurre es que hay pocos casos RR (y también pocos QQ en realidad) y muchos QR un problema denominado de exceso de heterocigotos. Este exceso podría en este caso ser atribuido a la presencia de una selección sobredominante o la existencia de migraciones en la población estudiada.

En un trabajo de Voescht en población joven se encontró que el polimorfismo Gln/Arg192 (genotipo RR) estaba de manera independiente asociado a ictus no mortal en adultos jóvenes (535), con incremento del riesgo de 4 veces (OR 4,1; 95% IC, 1.14 a 14.73). Ellos encontraron al calcular el número de alelos de riesgo 192R y 55L que portaba cada sujeto, que se duplicaba el riesgo de IS entre los portadores de 2 o más de estos alelos (OR=1.5; 95%IC, 0,94-3.2). La asociación no randomizada es debida al desequilibrio de ligamiento que une el alelo R en posición 192 al alelo frecuente L en posición 55. Se ha sugerido que la presencia de ambos alelos en sujetos expuestos a otros factores de riesgo incrementa la peroxidación de las partículas LDL y disminuye la actividad de la PON 1 como tabaco, (537), o

diabetes (538). No obstante en contraposición se ha encontrado esta asociación con sujetos no fumadores (543).

En una población multirracial se ha visto en pacientes portadores del polimorfismo Q192 una relación inversa entre el riesgo vascular y la ingesta de ácido fólico (544). Otro polimorfismo estudiado y que se ha relacionado con la enfermedad vascular es *rs854560* (c.163T_A o p.Leu55Met)(328), aunque no se confirmó en un metanálisis posterior (329).

Se ha mostrado una susceptibilidad incrementada a EAC, a un mayor Grosor Íntima-Media y al IS entre portadores del alelo 192R, con un incremento del riesgo que varía entre 1,7 y 8,8 veces, hay trabajos que no han mostrado tal asociación (535, 545). Shenhar-Tsarfaty no encontró relación con el GIM, aunque sí una correlación inversa entre la actividad de la PON1 y el proceso aterosclerótico (546). Por otra parte metanálisis posteriores apoyan la relación del IS con el polimorfismo Q192R (alelo R y genotipo RR)(547). En este sentido hay un trabajo que plantea una mayor capacidad predictiva para la enfermedad vascular al fenotipo de la PON1 que al genotipo (548).

En nuestro análisis por haplotipos (PON1 G1192Arg y Met55Leu) nosotros no encontramos diferencias entre casos y controles para haplotipos verdaderos e inferidos mediante el software haplo.stat implementado en entorno R.

En cuanto a la distribución por subtipos etiológicos en la literatura se ha planteado que la presencia de ciertos alelos puede disminuir o incrementar el riesgo de un subtipo específico; se han descrito asociaciones débiles como mujeres con ictus lacunar y hombres con el cardioembólico (337). No obstante los resultados hay que interpretarlos con cautela dado el escaso número de

pacientes que nos encontramos en cada subtipo etiológico (337). Hay un estudio de casos-control en población iraní que encontró asociación del SNP 192R con el subtipo de ictus lacunar (549), aunque limitado por el número bajo de pacientes.

Los SNP pueden afectar a la unión de microRNA con un gen diana, llamándose miRSNP y así afectar a la expresión génica e influir en la susceptibilidad a padecer la enfermedad (550). Un trabajo reciente mostró como los miRSNP de la PON1 se asocian a un aumento del riesgo de IS y aterosclerosis subclínica (332).

Polimorfismos Cys311Ser de paraoxonasa 2

En nuestra serie en análisis univariante encontramos un riesgo significativo asociado a la homocigosis Cys311 que se sostuvo en análisis multivariante.

La Paraoxonasa 2 se expresa de manera ubicua, estando presente en múltiples tejidos humanos como pulmón, hígado, corazón e intestino (331), y no parece estar asociada a las partículas de HDL, al contrario que las PON 1 y 3 (331). También se considera con propiedades antiaterogénicas al proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (337). Hay 2 SNP frecuentes del gen de la PON 2, que serían PON 2-148 [C/G: Ala (A)/Gly(G)] y PON 2-311 [C/G: Cys(C)/Ser(S)], y el PON2-148 "G(variante G), asociados a altos niveles basales de glucosa; el PON 2-311 "G" (alelo S) se ha asociado a EAC (341). A pesar del interés creciente hay menos información acerca de la PON 2 y sus funciones.

Pan y colaboradores encontraron que el polimorfismo PON2 Ser311 se asociaba a EAC (342), por el contrario otro trabajo solo encontró asociación en

los sujetos con tabaquismo (343). Este polimorfismo se ha asociado en pacientes con ictus de gran vaso (344), aunque hay datos contrapuestos (330, 337). Un metanálisis posterior tampoco encontró asociación, aunque un análisis por etnias sugería una posible asociación en población europea (345). Este polimorfismo se ha asociado a ictus de mayor gravedad (346). Otro trabajo, realizado por Cozzi y colaboradores encontró que el polimorfismo PON2 Cys311Ser un cofactor de riesgo en la asociación anterior de PON1 y con otros factores de riesgo (347).

Polimorfismos del Sistema renina angiotensina: Análisis del polimorfismo A1166C del gen del receptor de la angiotensina

El sistema renina angiotensina (SRA) es clave para el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis cardiovascular (287). Se han descrito diversos polimorfismos que pueden afectar a su función, que además pueden tener relación con la aparición de eventos vasculares (288).

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) tiene un papel crucial en el SRA, se ha identificado un polimorfismo (I/D, dbSNP rs4646994) basado en la presencia (inserción I) o ausencia (delección D) de un fragmento 287-bp DNA que se asocia a una elevación de ECA y se ha postulado como una potencial susceptibilidad para el IS, aunque ha sido objeto de controversia (291, 293, 294). No obstante un metanálisis concluyó que la presencia de alelo D del polimorfismo ACE I/D es un marcador de susceptibilidad con baja penetrancia para el IS (295). También se ha encontrado aumento de riesgo para el genotipo ACE DD y para el alelo D, riesgo aumentado tanto para IS como hemorrágico (551). Por el contrario otro trabajo mostró un beneficio de los inhibidores de ECA para el riesgo de infarto miocardio o cerebral que

portadores del alelo AGTR1 573C (552). Un trabajo reciente no demostró una asociación significativa entre IS y el polimorfismo de la ECA inserción/delección, no obstante demostró mayor riesgo para la enfermedad de pequeño vaso, en el límite de la significación con el genotipo DD (553).

La angiotensina II (ATII) es un péptido biológicamente activo que se une al receptor tipo 1 de la AT II (AT1R) cuyo bloqueo disminuye la presión arterial (296). Tenemos trabajos que vinculan diversas variantes del ATR1 relacionados con la enfermedad vascular (298, 299) y con el ictus en particular, como los que analizan la asociación con el polimorfismo (A1166C) del AT1R (300, 301). No obstante ha sido objeto de controversia y hay metanálisis que no lo apoyan (288). Marcianti y colaboradores realizaron un estudio epidemiológico, el objetivo era valorar la asociación de haplotipos frecuentes en sujetos hipertensos. Estudiaron los genes del angiotensinógeno (AGT), renina, ECA, los del receptor tipo 1 y 2, los resultados no arrojaron asociaciones significativas con el riesgo de ictus o de infarto de miocardio (554).

Los polimorfismos en los genes que sintetizan la aldosterona se han asociado a patología vascular cerebral y la muerte por ictus (303). Existen evidencias de polimorfismos del gen de la aldosterona sintetasa CYP11B2 rs1799998 (-344C/T), que se han asociado al riesgo de IS y al de isquemia cerebral recurrente (555).

Se han estudiado dos SNP del angiotensinógeno (rs4762, T207M) y no se ha visto relación con el IS (IS), pero parecen estar implicados en IH, y con el nivel funcional de estos pacientes tras el ictus (556). También se ha analizado el efecto de los fármacos inhibidores de la ECA, observando en estos pacientes

que los portadores del alelo M235T tienen aumentado el riesgo de ictus e IAM (557).

Los resultados de los estudios de intervención con fármacos que inhiben el SRA han demostrado un beneficio en la incidencia de ictus y de enfermedad vascular en general (304, 305).

En nuestra serie se realizó el estudio del polimorfismo A1A66C del gen del AT1R y se analizó la prevalencia de los alelos, de esta manera encontramos que era mayor la prevalencia del alelo A434 respecto a 172 C, y del genotipo A/A (151), seguido del A/C (132) y de 20 C/C.

El polimorfismo A1166C se ha asociado en trabajos previos a obesidad, hipertensión, masa de ventrículo izquierdo y a aterosclerosis (297, 299), dado que la enfermedad vascular en los distintos lechos arteriales afectados tiene mecanismos patogénicos similares se ha intentado establecer vínculos con la enfermedad vascular cerebral. Por un lado tenemos un trabajo Hindorff que no encontró asociación el polimorfismo A1166C con la hipertensión, ni eventos vasculares (302), otro posterior de Rubattu en el que este SNP se encontraba asociado al riesgo de IS, además el riesgo de ictus se eleva de manera aditiva en presencia de hipertensión (300). También encuentran que el riesgo de ictus está elevado de 2 a 4 veces en función de la presencia de heterocigosis respecto a homocigosis. En relación con los hallazgos de Rubattu debemos reseñar que estos hallazgos fueron en una población de Cerdeña, bastante homogénea desde el punto de vista genético.

Un trabajo de Li de 2.010 también sugiere que los portadores del alelo D del polimorfismo I/D de la ECA tienen un mayor riesgo de ictus y que el uso de

ACO en ellos puede aumentar el riesgo de ictus, especialmente del hemorrágico (558).

En el metanálisis de Zhang se analizó la asociación de los fenotipos AC/CC y no encontraron diferencias en el riesgo tomados conjuntamente, al igual que en el análisis de subgrupos en las poblaciones estudiadas (288). No obstante estos autores plantean la necesidad de analizar muestras más amplias, dado que encuentran limitaciones como la participación de múltiples genes en la regulación del SRA y que el incremento del riesgo de ictus asociado a un solo gen es modesto. En este sentido se ha sugerido la conveniencia de realizar un análisis sistemático de los SNP de múltiples genes del SRA. Por otra parte aunque un polimorfismo puede interactuar con factores ambientales, los trabajos de Zhang no han conseguido probar que existan datos suficientes de la interacción de este polimorfismo con factores ambientales que pudiesen incrementar el riesgo vascular. También plantean que la heterogeneidad de las poblaciones, en lo tocante a edad, sexo, raza, origen étnico, presión arterial o índice de masa corporal, puede ser la causa de la ausencia de relación en estudio.

Szolnoki en un trabajo encontró relación del polimorfismo AT1R 1166C con la enfermedad de pequeño vaso y además documentó sinergias a la hora de incrementar el riesgo cuando se asocia con el genotipo D/D de la ECA. Ellos encontraron que la coexistencia de ambos, homocigosis ACE D/D y al menos un alelo AT1R 1166C era más frecuente en el grupo con ictus que en los controles (22.4 vs 11%, $p < 0.005$, OR, 2.33; 95% IC, 1.46–3.7), además la sinergia era mayor para enfermedad de pequeño vaso (OR, 3.44; 95% IC, 1.9–6.24; $p < 0.0005$) (559).

Un trabajo previo realizado también en población canaria con EAC no se encontró relación con el polimorfismo AT1R (A1166C), mientras que si la hubo con la homocigosis TT del gen del angiotensinógeno. Este último parece más prevalente en nuestra población que en otras poblaciones occidentales (560).

Las lesiones de sustancia blanca subclínicas (LSB) pueden representar un signo precoz de lesión de órgano diana en sujetos hipertensos (561). Se ha postulado la existencia de una base genética vinculada a su patogenia, y entre los genes candidatos están los relacionados con el SRA (562, 563). La homocigosis para la variante de delección en el SPN de la ECA (I/D) y de 1 o 2 alelos C de la A166 parece aumentar el riesgo de LSB (562, 563). La presencia del alelo C y el genotipo CC de la A1166c se ha asociado además con la gravedad de las LSB (564). No obstante hay trabajos posteriores, que aunque encuentran relación con este SNP, el volumen de lesión es inferior al que documentaron con la asociación de un SNP de la “Óxido Nítrico Sintetasa” (301). Un trabajo posterior en el seno del *Rotherdam Study* encontró una interacción entre este polimorfismo y el alelo AGT2235T del gen de la angiotensina que favorecería la presencia de LSB (565).

Limitaciones y aplicación

Limitaciones del estudio

La primera de las limitaciones es un sesgo de selección a la hora de incluir pacientes. A pesar de que se trata de una serie hospitalaria de pacientes consecutivos, existe un porcentaje de pacientes no reclutados debido a la variable gravedad inherente del ictus. Los pacientes muy graves, tienen una alta mortalidad precoz y por consiguiente no llegan a ingresar y fallecieron en el área de Urgencias. Además debemos contar aquellos pacientes con AIT o con ictus leves, que son dados de alta para realizar estudio ambulatorio. Finalmente tampoco ingresan pacientes con una alta comorbilidad que son destinados a Medicina Interna o a un centro concertado.

Otra limitación de nuestro trabajo es la relacionada con emparejamiento de la población del Estudio Procagene. Esta población es más joven que nuestra población de casos. Debemos tener en cuenta la dificultad a la hora de seleccionar paciente como control, toda vez que en sujetos añosos es más frecuente la presencia de factores de riesgo y de enfermedad vascular y por ende es más difícil encontrar sujetos añosos sanos.

Finalmente señalar que el riesgo asociado a cada una de las variantes es bajo, circunstancia que ha impulsado el desarrollo de colaboraciones internacionales que puedan englobar muestras poblacionales de mayor tamaño y así conseguir resultados con una adecuada significación estadística.

Aplicación práctica del estudio

La principal utilidad del estudio es la conocer la prevalencia de ciertas variables genéticas que puedan conllevar un mayor riesgo de padecer enfermedad vascular. De esta forma se pueden desarrollar algoritmos predictivos de sufrir un evento clínico, con ello se pueden implementar

estrategias de prevención de enfermedad vascular que serían individualizadas y en concordancia con el riesgo de enfermedad vascular en cada sujeto.

Conclusiones

Conclusiones

La replicación de las variantes descritas en la población de Gran Canaria muestra una asociación significativa entre el riesgo de ictus isquémico y la distribución de genotipos Gln192Arg en el gen Paraoxonasa 1.

No observamos una contribución significativa por haplotipos del gen Paraoxonasa 1 en el riesgo de ictus isquémico.

La replicación de las variantes descritas muestra una asociación significativa entre el riesgo de ictus isquémico y la distribución de genotipos Cys311Ser en el gen Paraoxonasa 2.

En el análisis multivariante, ajustado para factores de confusión, la variante Cys311Ser en el gen Paraoxonasa 2 se asocia con un riesgo incrementado de ictus isquémico en la población de Gran Canaria.

El tabaco, el género masculino, la edad, la concentración de ácido Fólico y la concentración de Homocisteína plasmática total, la concentración de Colesterol total y el genotipo “portador del alelo Cys311 de la variante PON2 (Cys31Ser)” se constituyen en predictivas en el modelo ajustado.

Anexos

Anexo 1: Definiciones

Alelo: Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Desequilibrio de ligamiento: propiedad de algunos genes de las poblaciones genéticas de no segregarse de forma independiente, esto es, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50%. Esto suele deberse a que los dos loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anafase.

Endofenotipos: Son rasgos medibles que se han postulado como factor de confusión en las vías que se relacionan con la expresión de la enfermedad desde la variación genética.

Exoma: Es la parte del genoma formado por los exones, es decir, las partes codificantes de los genes que formarán parte del ARN mensajero maduro y, al ser éste traducido por la maquinaria celular, darán lugar a las proteínas. Es la parte funcional más importante del genoma y la que contribuye en mayor medida al fenotipo final de un organismo

Genoma: Es el conjunto de genes contenidos en los cromosomas, lo que puede interpretarse como la totalidad de la información genética que posee un organismo o una especie en particular.

Genotipado: Determinar qué variaciones específicas existen en el individuo

Genotipo: Se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN.

Exón: Región que codifica para una determinada proteína.

Haplotipo: Combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci.

Imputación: Proceso de inferencia observado (no genotipado). SNP por desequilibrio de ligamiento y comparando los genotipos de la población estudiada con los paneles de referencia que han sido secuenciados o genotipados.

Intrón: Región del ADN que debe ser eliminada de la transcripción primaria de ARN.

Locus: En latín, lugar; el plural es loci, es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador (marcador genético).

Minor allele frequency (MAF): La mayoría de los alelos tienen una sola variante y así, dos alelos posibles: el alelo principal lo porta la mayoría de la población, mientras el alelo menor es menos frecuente. Los SNP se pueden categorizar como frecuentes (MAF>5%), poco frecuentes (MAF 0,5-5%) y privados (presentes en una sola familia).

Panel de genes: Un panel de genes se designa para evaluar ciertas partes de los genes, codificantes o no, que cuando mutan causan una enfermedad o confieren un riesgo para la misma.

Penetrancia: Proporción de individuos con una misma mutación que tienen signos clínicos. La mayoría de las variantes génicas tienen una Penetrancia incompleta condicionando un aumento del riesgo de ictus en portadores que no han desarrollado el fenotipo completo de enfermedad.

Single nucleotide polymorphism (SNP): El tipo más frecuente de variante genética.

SNP types: Los SNP puede estar en la región no codificante de los genes, que se clasifican como no sinónimos (la cadena de aminoácidos está preservada), o en regiones intergénicas. Además los SNP no codificantes pueden tener un efecto funcional en el ensamblaje de genes, en el factor de transcripción de la unión en la degradación de mRNA, o en la secuencia de RNA no codificantes.

Variante: Una diferencia en una secuencia de DNA cuando se compara con una referencia normal.

Whole exome sequencing: Secuenciar las regiones codificantes, o exones, de un genoma completo.

Whole genome sequencing: Secuenciar el DNA que se dirige al genoma completo, proporciona regiones codificantes (exones) y no codificantes, incluyendo intrones y regiones intergénicas.

Anexo 2: Abreviaturas

ABCB1: Gen *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)*

ACO: Anticonceptivos orales

AEP: Ácido eicosapentanoico

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AFL: Anticuerpos antifosfolípidos de membrana

AGT: Angiotensinógeno

AIT: Ataque isquémico transitorio

AL: Anticoagulante lúpico

ANRIL: RNA no codificante antisentido (*antisense non-coding RNA*)

APOE: Apolipoproteína E

APCSC: *Asia Pacific Cohort Studies Collaboration*

ARIC: *Atherosclerosis Risk in Communities*

ASA: Aneurisma del septo interauricular

ATII: Angiotensina II

ATIIr: Receptor tipo 1 de la AAT II

ATP III: *Adult Treatment Program*

bp DNA: Par de bases del DNA de doble hélice (*DNA double helix base pair*)

BRAP: Gen *BRCA-1 associated protein*

CAC: Comunidad autónoma de Canarias

CADASIL: “Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía”

CETP: *Cholesteryl ester transfer protein*

Chr: Cromosoma

Chr 9p21: Posición 21 del brazo corto cromosoma 9

CI: Cardiopatía isquémica

CPAP: Presión positiva continua

CARASIL: *Cerebral autosomal-recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*

CHS: *Cardiovascular Health Study*

CINa: Cloruro sódico

dbSNP: Par de bases de SNP ¿?

Delección D:

DHA: Ácido docosahexaenoico

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EAC: Enfermedad coronaria o cardiopatía isquémica

EAP: Enfermedad arterial periférica

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

ECV: Enfermedad cerebrovascular

EDN: Endotelina-1

EDNRB: Receptor tipo B de la endotelina

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial neural

FA: Fibrilación auricular

FANV: Fibrilación auricular no valvular

FDA: *Food and Drug Administration*

FOP: Foramen oval permeable

FR: Factor de riesgo

FSC: Flujo sanguíneo cerebral

FVL: Factor V de Leiden

GBA: Glucemia Basal Alterada

GIM: Grosor Íntima Media

GOCHA: *Genetics of Cerebral Hemorrhage with Anticoagulation*

GWAS: Estudio de asociación a genoma completo (*Genome wide association*)

HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad

Hcy: Homocisteína

HSA: Hemorragia subaracnoidea

HTA: Hipertensión arterial

IAM: Infarto agudo de miocardio

IC: Intervalo de confianza

IDF: *International Diabetes Federation*

IH: Ictus hemorrágico

IL: Interleukina

IMC: Índice de masa corporal

INR: *International normalized ratio*

IS: Ictus isquémico

HMGCR: Hidroximetilglutarato coenzima A reductasa

INK4: Proteína supresora tumor

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible por citocinas

INR: *International normalized ratio*

HVI: Hipertrofia ventricular izquierda

HTRA1: gen HtrA serina proteasa 1

LACI: *Lacunar anterior circulation infarct*

LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad

Lp(a): Lipoproteinlipasa A

LSB: Lesiones de sustancia blanca

LTA: Linfotóxina-alfa

miRNA : Micro RNA

MDR: *Multifactor dimensionality reduction*

MONICA: *Monitory Cardiovascular Diseases*

MMP3: Metaloproteínasa 3

MRFIT: *Multiple Risk Factor Intervention Trial*

MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa

NINDS: *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*

nNOS: Óxido nítrico sintetasa neural

OCSP: *Oxfordshire Stroke Project Classification*

ON: Óxido nítrico

PACI: *Partial anterior circulation infarct*

PAD: Presión arterial diastólica

PAI-1: Inhibidor del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor-1*)

PAS: Presión arterial sistólica

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PCRus: Proteína C Reactiva de alta sensibilidad

POCI: *Posterior circulation infarct*

PON: Paraoxonasa

PstI: Entima tipo 2 (endonucleasa de restricción)

PVM: Prolapso de la válvula mitral

RMN: Resonancia magnética craneal

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RR: Riesgo relativo

SAF: Síndrome antifosfolípido

SAHOS: Síndrome Apneas-hipopneas de sueño

SM: Síndrome metabólico

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

SRA: Sistema renina angiotensina

TAC: Tomografía computarizada craneal

TACI: *Total anterior circulation infarct*

TAG: Tolerancia Alterada a la Glucosa

TEP: Tromboembolismo pulmonar

TPA: Activador tisular del plasminógeno (*tissue-type plasminogen activator*)

THS: Tratamiento hormonal sustitutivo

TC: Tomografía computarizada

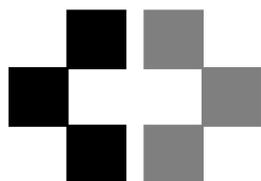
TG: Triglicéridos

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TTR: Gen transtiretina

TVC: Trombosis venosa cerebral

Anexo 3: Consentimiento informado



Servicio _____

Canario de Salud _____

Nº REGISTRO:

NOMBRE:

Hospital de Gran Canaria

Dr. Negrin

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO **“ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE EVENTOS CEREBROVASCULARES Y VARIANTES GENÉTICAS: GENES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA, PAROXONASA Y METILENTETRAHIDROREDUCTASA”**

Estimado/a Señor/a:

Su médico le ha solicitado de palabra participar en este estudio, ahora y en cumplimiento de la Ley General de Sanidad, reiteramos la explicación por escrito con objeto de que nos autorice a incluirlo en este estudio. Es importante que usted conozca la finalidad y los procedimientos llevados a cabo en este estudio, lea atentamente esta información y no dude en comentar con su médico, al investigador o a cualquiera de sus colaboradores todas aquellas cuestiones que no le queden claras.

ANTECEDENTES

Estamos llevando a cabo un estudio sobre los diferentes polimorfismos genéticos que pueden estar relacionados con la aparición del ictus. Actualmente se han descrito algunos polimorfismos relacionados con el ictus, aunque no se ha establecido la prevalencia de los mismos en nuestra población

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo del estudio es establecer la prevalencia de los diferentes polimorfismos genéticos en la población que ha sufrido un ictus.

DESCRIPCION DEL ESTUDIO

Su participación en el estudio solamente implicaría una extracción de sangre, un cuestionario dietético y un examen físico antropométrico (peso, talla, perímetro braquial...)

RIESGOS DEL ESTUDIO

No se prevé que su participación en el estudio pueda resultar perjudicial para su salud.

BENEFICIOS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Su médico controlará su enfermedad y su evolución estrechamente durante todo el estudio.

OBLIGACIONES

Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Usted puede negarse a participar o a retirarse del estudio en cualquier momento sin que de ello se derive ningún perjuicio ni pérdida de los beneficios sanitarios a los que Usted tiene derecho.

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO

Usted será informado de todos los avances o nuevos descubrimientos que se realicen durante el curso de esta investigación que puedan influir en su salud.

CONFIDENCIALIDAD

Todos los datos recogidos en el transcurso del estudio serán tratados de forma estrictamente confidencial y serán utilizados para la valoración del estudio sin desvelar en ningún momento su nombre ni apellidos. Todas las personas que forman parte del equipo investigador están obligadas a mantener el secreto profesional.

COMITES ETICOS

El presente protocolo de estudio ha sido revisado por un Comité Ético y por las Autoridades Sanitarias Españolas, quienes han otorgado una opinión favorable del mismo.

DECLARACION

D/DÑA:.....**con D.N.I.**

Mediante el presente documento **DOY MI AUTORIZACION** para participar en este estudio

- He leído la información y he podido hacer preguntas sobre el mismo
- Considero que la información recibida es suficiente.
- He hablado con el Dr.----- (investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos

Y para que así conste, firmo el presente documento, después de haberlo leído y comprendido, y por mi propia voluntad.

En Las Palmas a....de.....de.....

Firma del Participante

Bibliografía

Bibliografía

1. Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009 Jun;40(6):2276-93. PubMed PMID: 19423857.
2. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Jul;44(7):2064-89. PubMed PMID: 23652265.
3. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1993 Jan;24(1):35-41. PubMed PMID: 7678184.
4. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet neurology*. 2009 Apr;8(4):355-69. PubMed PMID: 19233729.
5. Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, Boysen G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2006 Jun;13(6):581-98. PubMed PMID: 16796582.
6. Diaz-Guzman J, Egado-Herrero JA, Fuentes B, Fernandez-Perez C, Gabriel-Sanchez R, Barbera G, et al. [Incidence of strokes in Spain: the Iberictus study. Data from the pilot study]. *Revista de neurologia*. 2009 Jan 16-31;48(2):61-5. PubMed PMID: 19173202. Incidencia de ictus en Espana: estudio Iberictus. Datos del estudio piloto.
7. Kunst AE, Amiri M, Janssen F. The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011 Aug;42(8):2126-30. PubMed PMID: 21700943.
8. Hallstrom B, Jonsson AC, Nerbrand C, Norrving B, Lindgren A. Stroke incidence and survival in the beginning of the 21st century in southern Sweden: comparisons with the late 20th century and projections into the future. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2008 Jan;39(1):10-5. PubMed PMID: 18063825.
9. Lackland DT, Roccella EJ, Deutsch AF, Fornage M, George MG, Howard G, et al. Factors influencing the decline in stroke mortality: a statement from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014 Jan;45(1):315-53. PubMed PMID: 24309587.
10. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1988 Sep;19(9):1083-92. PubMed PMID: 3413804.
11. Writing Group M, Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010 Feb 23;121(7):e46-e215. PubMed PMID: 20019324.
12. Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, et al. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Feb;37(2):345-50. PubMed PMID: 16397184.
13. Wolfe CD, Giroud M, Kolominsky-Rabas P, Dundas R, Lemesle M, Heuschmann P, et al. Variations in stroke incidence and survival in 3 areas of Europe. *European Registries of Stroke*

(EROS) Collaboration. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000 Sep;31(9):2074-9. PubMed PMID: 10978032.

14. Lopez-Pousa S, Vilalta J, Llinas J. [Prevalence of cerebrovascular disease in Spain: a study in a rural area of Girona]. *Revista de neurologia*. 1995 Sep-Oct;23(123):1081-6. PubMed PMID: 8556597. Prevalencia de la enfermedad vascular cerebral en Espana: estudio en un area rural de Girona.

15. Marrugat J, Arboix A, Garcia-Eroles L, Salas T, Vila J, Castell C, et al. [The estimated incidence and case fatality rate of ischemic and hemorrhagic cerebrovascular disease in 2002 in Catalonia]. *Revista espanola de cardiologia*. 2007 Jun;60(6):573-80. PubMed PMID: 17580045. Estimacion de la incidencia poblacional y la mortalidad de la enfermedad cerebrovascular establecida isquemica y hemorragica en 2002.

16. Caicoya M, Rodriguez T, Lasheras C, Cuellar R, Corrales C, Blazquez B. [Stroke incidence in Asturias, 1990-1991]. *Revista de neurologia*. 1996 Jul;24(131):806-11. PubMed PMID: 8681191. Incidencia del accidente cerebrovascular en Asturias: 1990-1991.

17. Sempere AP, Duarte J, Cabezas C, Claveria LE. Incidence of transient ischemic attacks and minor ischemic strokes in Segovia, Spain. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1996 Apr;27(4):667-71. PubMed PMID: 8614927.

18. Matias-Guiu J, Oltra A, Falip R, Martin R, Galiano L. Occurrence of transient ischemic attacks in Alcoi: descriptive epidemiology. *Neuroepidemiology*. 1994;13(1-2):34-9. PubMed PMID: 8190204.

19. Bermejo F, Vega S, Morales JM, Diaz J, Lopez L, Parra D, et al. Prevalence of stroke in two samples (rural and urban) of old people in Spain. A pilot door-to-door study carried out by health professionals. *Neurologia*. 1997 Apr;12(4):157-61. PubMed PMID: 9184014.

20. Boix R, del Barrio JL, Saz P, Rene R, Manubens JM, Lobo A, et al. Stroke prevalence among the Spanish elderly: an analysis based on screening surveys. *BMC neurology*. 2006;6:36. PubMed PMID: 17042941. Pubmed Central PMCID: 1626484.

21. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010 Feb 23;121(7):948-54. PubMed PMID: 20177011.

22. Luengo-Fernandez R, Paul NL, Gray AM, Pendlebury ST, Bull LM, Welch SJ, et al. Population-Based Study of Disability and Institutionalization After Transient Ischemic Attack and Stroke: 10-Year Results of the Oxford Vascular Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Aug 6. PubMed PMID: 23920019.

23. Viswanathan A, Rocca WA, Tzourio C. Vascular risk factors and dementia: how to move forward? *Neurology*. 2009 Jan 27;72(4):368-74. PubMed PMID: 19171835. Pubmed Central PMCID: 2677504.

24. Wang G, Zhang Z, Ayala C, Dunet DO, Fang J, George MG. Costs of Hospitalization for Stroke Patients Aged 18-64 Years in the United States. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2013 Aug 15. PubMed PMID: 23954598.

25. Mar J, Alvarez-Sabin J, Oliva J, Becerra V, Casado MA, Yébenes M, et al. The costs of stroke in Spain by aetiology: the CONOCES study protocol. *Neurologia*. 2013 Jul-Aug;28(6):332-9. PubMed PMID: 22995527.

26. Hunter RM, Davie C, Rudd A, Thompson A, Walker H, Thomson N, et al. Impact on clinical and cost outcomes of a centralized approach to acute stroke care in london: a comparative effectiveness before and after model. *PloS one*. 2013;8(8):e70420. PubMed PMID: 23936427. Pubmed Central PMCID: 3731285.

27. Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet neurology*. 2007 Feb;6(2):182-7. PubMed PMID: 17239805.

28. Hofmeijer J, van der Worp HB, Kappelle LJ, Eshuis S, Algra A, Geving JP, et al. Cost-Effectiveness of Surgical Decompression for Space-Occupying Hemispheric Infarction. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Aug 13. PubMed PMID: 23943217.

29. Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. Stroke; a journal of cerebral circulation. 1990 Apr;21(4):637-76. PubMed PMID: 2326846.
30. Arboix A, Alvarez-Sabin J, Soler L. [Stroke. Classification and diagnostic criteria. Ad hoc Editorial Committee of the Task Force on Cerebrovascular Diseases of SEN]. Neurologia. 1998;13 Suppl 3:3-10. PubMed PMID: 9889525. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. Comité de Redacción ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN.
31. Asdaghi N, Hill MD, Coulter JI, Butcher KS, Modi J, Qazi A, et al. Perfusion MR Predicts Outcome in High-Risk Transient Ischemic Attack/Minor Stroke: A Derivation-Validation Study. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2013 Sep;44(9):2486-92. PubMed PMID: 23908062.
32. Furie KL, Kasner SE, Adams RJ, Albers GW, Bush RL, Fagan SC, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2011 Jan;42(1):227-76. PubMed PMID: 20966421.
33. Adams HP, Jr. Trials of trials in acute ischemic stroke. The Humana Lecture. Stroke; a journal of cerebral circulation. 1993 Sep;24(9):1410-5. PubMed PMID: 8362441.
34. Hachinski V. Classification of stroke for clinical trials. Stroke; a journal of cerebral circulation. 1990 Sep;21(9 Suppl):II27-9. PubMed PMID: 2205022.
35. Madden KP, Karanjia PN, Adams HP, Jr., Clarke WR. Accuracy of initial stroke subtype diagnosis in the TOAST study. Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment. Neurology. 1995 Nov;45(11):1975-9. PubMed PMID: 7501144.
36. Lanfranconi S, Markus HS. Stroke subtyping for genetic association studies? A comparison of the CCS and TOAST classifications. International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society. 2012 Apr 22. PubMed PMID: 22520626.
37. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. Lancet. 1991 Jun 22;337(8756):1521-6. PubMed PMID: 1675378.
38. Anderson CS, Taylor BV, Hankey GJ, Stewart-Wynne EG, Jamrozik KD. Validation of a clinical classification for subtypes of acute cerebral infarction. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 1994 Oct;57(10):1173-9. PubMed PMID: 7931376. Pubmed Central PMCID: 485481.
39. Committee CS. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet. 1996 Nov 16;348(9038):1329-39. PubMed PMID: 8918275.
40. Leys D, Woimant F, Ferrieres J, Bauters C, Touboul PJ, Guerillot M, et al. Detection and management of associated atherothrombotic locations in patients with a recent atherothrombotic ischemic stroke: results of the DETECT survey. Cerebrovascular diseases. 2006;21(1-2):60-6. PubMed PMID: 16330865.
41. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. Lancet. 2010 Jul 10;376(9735):112-23. PubMed PMID: 20561675.
42. Sacco RL, Ellenberg JH, Mohr JP, Tatemichi TK, Hier DB, Price TR, et al. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. Annals of neurology. 1989 Apr;25(4):382-90. PubMed PMID: 2712533.
43. Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM, et al. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. Stroke; a journal of cerebral circulation. 1997 Jul;28(7):1507-17. PubMed PMID: 9227708.
44. Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, Sytkowski P, Kase CS, Belanger AJ, et al. Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. Stroke; a journal of cerebral circulation. 1992 Nov;23(11):1551-5. PubMed PMID: 1440701.

45. Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1996 Mar;27(3):373-80. PubMed PMID: 8610298.
46. Marrugat J, Sala J, Aboal J. [Epidemiology of cardiovascular disease in women]. *Rev Esp Cardiol*. 2006 Mar;59(3):264-74. PubMed PMID: 16712751. Epidemiologia de las enfermedades cardiovasculares en la mujer.
47. Sacco RL, Boden-Albala B, Gan R, Chen X, Kargman DE, Shea S, et al. Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *American journal of epidemiology*. 1998 Feb 1;147(3):259-68. PubMed PMID: 9482500.
48. Prencipe M, Ferretti C, Casini AR, Santini M, Giubilei F, Culasso F. Stroke, disability, and dementia: results of a population survey. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997 Mar;28(3):531-6. PubMed PMID: 9056607.
49. Kissela BM, Khoury J, Kleindorfer D, Woo D, Schneider A, Alwell K, et al. Epidemiology of ischemic stroke in patients with diabetes: the greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Diabetes care*. 2005 Feb;28(2):355-9. PubMed PMID: 15677792.
50. Kissela B, Schneider A, Kleindorfer D, Khoury J, Miller R, Alwell K, et al. Stroke in a biracial population: the excess burden of stroke among blacks. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Feb;35(2):426-31. PubMed PMID: 14757893.
51. Kleindorfer D, Broderick J, Khoury J, Flaherty M, Woo D, Alwell K, et al. The unchanging incidence and case-fatality of stroke in the 1990s: a population-based study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Oct;37(10):2473-8. PubMed PMID: 16946146.
52. Beltran-Blasco I, Medrano V, Sanchez-Perez RM, Molto-Jorda JM, Matias-Guiu Guia J. [Differences between Spanish ischemic stroke patients and those from Central and Northern Europe. A case-control study]. *Revista de neurologia*. 2005 Feb 16-28;40(4):193-8. PubMed PMID: 15765312. Diferencias entre pacientes con ictus isquémico españoles frente a centro y nordeuropeos: un estudio de casos y controles.
53. Saunders E, Ofili E. Epidemiology of atherothrombotic disease and the effectiveness and risks of antiplatelet therapy: race and ethnicity considerations. *Cardiology in review*. 2008 Mar-Apr;16(2):82-8. PubMed PMID: 18281910.
54. Park IU, Taylor AL. Race and ethnicity in trials of antihypertensive therapy to prevent cardiovascular outcomes: a systematic review. *Annals of family medicine*. 2007 Sep-Oct;5(5):444-52. PubMed PMID: 17893387. Pubmed Central PMCID: 2000316.
55. Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Myers RH. Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1993 Sep;24(9):1366-71. PubMed PMID: 8362432.
56. Liao D, Myers R, Hunt S, Shahar E, Paton C, Burke G, et al. Familial history of stroke and stroke risk. The Family Heart Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997 Oct;28(10):1908-12. PubMed PMID: 9341694.
57. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Jan;35(1):212-27. PubMed PMID: 14684773.
58. Qiu LX, Zhang J, Li WH, Zhang QL, Yu H, Wang BY, et al. Lack of association between methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism and breast cancer susceptibility. *Molecular biology reports*. 2011 Apr;38(4):2295-9. PubMed PMID: 21052845.
59. Jerrard-Dunne P, Evans A, McGovern R, Hajat C, Kalra L, Rudd AG, et al. Ethnic differences in markers of thrombophilia: implications for the investigation of ischemic stroke in multiethnic populations: the South London Ethnicity and Stroke Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Aug;34(8):1821-6. PubMed PMID: 12843341.
60. Zhang YG, Li XB, Zhang J, Huang J, He C, Tian C, et al. The I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and asthma risk: a meta-analysis. *Allergy*. 2011 Feb;66(2):197-205. PubMed PMID: 20880211.

61. Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, Malik R, Paul NL, Jackson C, et al. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Dec;43(12):3161-7. PubMed PMID: 23042660.
62. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995 May 1;91(9):2488-96. PubMed PMID: 7729036.
63. Hindorff LA, Lemaitre RN, Smith NL, Bis JC, Marcianti KD, Rice KM, et al. Common genetic variation in six lipid-related and statin-related genes, statin use and risk of incident nonfatal myocardial infarction and stroke. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008 Aug;18(8):677-82. PubMed PMID: 18622260. Pubmed Central PMCID: 2736793.
64. Flavell DM, Jamshidi Y, Hawe E, Pineda Torra I, Taskinen MR, Frick MH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *Circulation*. 2002 Mar 26;105(12):1440-5. PubMed PMID: 11914252.
65. Banerjee A, Lim CC, Silver LE, Welch SJ, Banning AP, Rothwell PM. Familial history of stroke is associated with acute coronary syndromes in women. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2011 Feb;4(1):9-15. PubMed PMID: 21288889.
66. Rubattu S, Stanzione R, Gigante B, Bagalino A, Musumeci B, Volpe M. Genetic susceptibility to cerebrovascular accidents. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2001 Nov;38 Suppl 2:S71-4. PubMed PMID: 11811383.
67. Nicolaou M, DeStefano AL, Gavras I, Cupples LA, Manolis AJ, Baldwin CT, et al. Genetic predisposition to stroke in relatives of hypertensives. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000 Feb;31(2):487-92. PubMed PMID: 10657427.
68. Turner ST, Fornage M, Jack CR, Jr., Mosley TH, Knopman DS, Kardia SL, et al. Genomic susceptibility Loci for brain atrophy, ventricular volume, and leukoaraiosis in hypertensive sibships. *Archives of neurology*. 2009 Jul;66(7):847-57. PubMed PMID: 19597086. Pubmed Central PMCID: 2828902.
69. Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, Bell R, D'Souza R, Jeffery S, et al. Homocysteine is a risk factor for cerebral small vessel disease, acting via endothelial dysfunction. *Brain : a journal of neurology*. 2004 Jan;127(Pt 1):212-9. PubMed PMID: 14607791.
70. Cheng YC, Anderson CD, Bione S, Keene K, Maguire JM, Nalls M, et al. Are myocardial infarction--associated single-nucleotide polymorphisms associated with ischemic stroke? *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Apr;43(4):980-6. PubMed PMID: 22363065. Pubmed Central PMCID: 3622211.
71. Dichgans M, Malik R, Konig IR, Rosand J, Clarke R, Gretarsdottir S, et al. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014 Jan;45(1):24-36. PubMed PMID: 24262325.
72. Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, Zambon A, Poikolainen K. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction*. 2000 Oct;95(10):1505-23. PubMed PMID: 11070527.
73. Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003 Feb 5;289(5):579-88. PubMed PMID: 12578491.
74. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B, Rundek T, Paik MC, Sacco RL. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Jan;37(1):13-9. PubMed PMID: 16306464.
75. Soyama Y, Miura K, Morikawa Y, Nishijo M, Nakanishi Y, Naruse Y, et al. High-density lipoprotein cholesterol and risk of stroke in Japanese men and women: the Oyabe Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Apr;34(4):863-8. PubMed PMID: 12637692.
76. Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A, Simonetti P. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy

- volunteers. *European journal of clinical nutrition*. 1996 Apr;50(4):209-13. PubMed PMID: 8730606.
77. McKenzie CR, Abendschein DR, Eisenberg PR. Sustained inhibition of whole-blood clot procoagulant activity by inhibition of thrombus-associated factor Xa. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996 Oct;16(10):1285-91. PubMed PMID: 8857926.
78. Hillbom M, Juvela S, Numminen H. Alcohol intake and the risk of stroke. *Journal of cardiovascular risk*. 1999 Aug;6(4):223-8. PubMed PMID: 10501273.
79. Gorelick PB, Rodin MB, Langenberg P, Hier DB, Costigan J. Weekly alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of ischemic stroke: results of a case-control study at three urban medical centers in Chicago, Illinois. *Neurology*. 1989 Mar;39(3):339-43. PubMed PMID: 2927640.
80. Djousse L, Levy D, Benjamin EJ, Blease SJ, Russ A, Larson MG, et al. Long-term alcohol consumption and the risk of atrial fibrillation in the Framingham Study. *The American journal of cardiology*. 2004 Mar 15;93(6):710-3. PubMed PMID: 15019874.
81. Athyros VG, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Papageorgiou AA, Ganotakis ES, Tziomalos K, et al. Association of drinking pattern and alcohol beverage type with the prevalence of metabolic syndrome, diabetes, coronary heart disease, stroke, and peripheral arterial disease in a Mediterranean cohort. *Angiology*. 2007 Dec-2008 Jan;58(6):689-97. PubMed PMID: 18216378.
82. Ariesen MJ, Claus SP, Rinkel GJ, Algra A. Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: a systematic review. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Aug;34(8):2060-5. PubMed PMID: 12843354.
83. Manolio TA, Kronmal RA, Burke GL, O'Leary DH, Price TR. Short-term predictors of incident stroke in older adults. The Cardiovascular Health Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1996 Sep;27(9):1479-86. PubMed PMID: 8784116.
84. Bhat VM, Cole JW, Sorkin JD, Wozniak MA, Malarcher AM, Giles WH, et al. Dose-response relationship between cigarette smoking and risk of ischemic stroke in young women. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2008 Sep;39(9):2439-43. PubMed PMID: 18703815. Pubmed Central PMCID: 3564048.
85. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *Bmj*. 1989 Mar 25;298(6676):789-94. PubMed PMID: 2496858. Pubmed Central PMCID: 1836102.
86. Wolf PA, D'Agostino RB, Kannel WB, Bonita R, Belanger AJ. Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1988 Feb 19;259(7):1025-9. PubMed PMID: 3339799.
87. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52. PubMed PMID: 15364185.
88. Feigin VL, Rinkel GJ, Lawes CM, Algra A, Bennett DA, van Gijn J, et al. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005 Dec;36(12):2773-80. PubMed PMID: 16282541.
89. Kurth T, Kase CS, Berger K, Gaziano JM, Cook NR, Buring JE. Smoking and risk of hemorrhagic stroke in women. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Dec;34(12):2792-5. PubMed PMID: 14615625.
90. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Jan 21;96(2):99-106. PubMed PMID: 14734699.
91. Kleindorfer D, Lindsell CJ, Alwell K, Woo D, Flaherty ML, Eilerman J, et al. Ischemic stroke survivors' opinion regarding research utilizing exception from informed consent. *Cerebrovascular diseases*. 2011;32(4):321-6. PubMed PMID: 21921594. Pubmed Central PMCID: 3712812.

92. Howard G, Thun MJ. Why is environmental tobacco smoke more strongly associated with coronary heart disease than expected? A review of potential biases and experimental data. *Environmental health perspectives*. 1999 Dec;107 Suppl 6:853-8. PubMed PMID: 10592142. Pubmed Central PMCID: 1566209.
93. Kool MJ, Hoeks AP, Struijker Boudier HA, Reneman RS, Van Bortel LM. Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers. *Journal of the American College of Cardiology*. 1993 Dec;22(7):1881-6. PubMed PMID: 8245343.
94. Silvestrini M, Troisi E, Matteis M, Cupini LM, Bernardi G. Effect of smoking on cerebrovascular reactivity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1996 Jul;16(4):746-9. PubMed PMID: 8964816.
95. Nakamura K, Barzi F, Lam TH, Huxley R, Feigin VL, Ueshima H, et al. Cigarette smoking, systolic blood pressure, and cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2008 Jun;39(6):1694-702. PubMed PMID: 18323508.
96. Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet*. 1996 Aug 24;348(9026):498-505. PubMed PMID: 8757151.
97. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, Bazzoli E, Archetti S, Assanelli D, et al. Synergistic effect of apolipoprotein E polymorphisms and cigarette smoking on risk of ischemic stroke in young adults. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Feb;35(2):438-42. PubMed PMID: 14726545.
98. Gu L, Su L, Chen Q, Liang B, Qin Y, Xie J, et al. Association between the apolipoprotein E gene polymorphism and ischemic stroke in Chinese populations: New data and meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013 Mar;5(3):853-9. PubMed PMID: 23407699. Pubmed Central PMCID: 3570227.
99. Zende PD, Bankar MP, Kamble PS, Momin AA. Apolipoprotein e gene polymorphism and its effect on plasma lipids in arteriosclerosis. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2013 Oct;7(10):2149-52. PubMed PMID: 24298461. Pubmed Central PMCID: 3843439.
100. Sloan MA, Kittner SJ, Feaser BR, Gardner J, Epstein A, Wozniak MA, et al. Illicit drug-associated ischemic stroke in the Baltimore-Washington Young Stroke Study. *Neurology*. 1998 Jun;50(6):1688-93. PubMed PMID: 9633712.
101. Khellaf M, Fenelon G. Intracranial hemorrhage associated with cocaine abuse. *Neurology*. 1998 May;50(5):1519-20. PubMed PMID: 9596038.
102. Mateo I, Pinedo A, Gomez-Beldarrain M, Basterretxea JM, Garcia-Monco JC. Recurrent stroke associated with cannabis use. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005 Mar;76(3):435-7. PubMed PMID: 15716544. Pubmed Central PMCID: 1739529.
103. Fonseca AC, Ferro JM. Drug abuse and stroke. *Current neurology and neuroscience reports*. 2013 Feb;13(2):325. PubMed PMID: 23299821.
104. Kaku DA, Lowenstein DH. Emergence of recreational drug abuse as a major risk factor for stroke in young adults. *Annals of internal medicine*. 1990 Dec 1;113(11):821-7. PubMed PMID: 2240897.
105. Qureshi AI, Suri MF, Guterman LR, Hopkins LN. Cocaine use and the likelihood of nonfatal myocardial infarction and stroke: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2001 Jan 30;103(4):502-6. PubMed PMID: 11157713.
106. Kaufman MJ, Levin JM, Ross MH, Lange N, Rose SL, Kukes TJ, et al. Cocaine-induced cerebral vasoconstriction detected in humans with magnetic resonance angiography. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1998 Feb 4;279(5):376-80. PubMed PMID: 9459471.
107. Siegel AJ, Sholar MB, Mendelson JH, Lukas SE, Kaufman MJ, Renshaw PF, et al. Cocaine-induced erythrocytosis and increase in von Willebrand factor: evidence for drug-related blood

- doping and prothrombotic effects. *Archives of internal medicine*. 1999 Sep 13;159(16):1925-9. PubMed PMID: 10493323.
108. Neiman J, Haapaniemi HM, Hillbom M. Neurological complications of drug abuse: pathophysiological mechanisms. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2000 Nov;7(6):595-606. PubMed PMID: 11136345.
109. Bushnell CD. Oestrogen and stroke in women: assessment of risk. *Lancet neurology*. 2005 Nov;4(11):743-51. PubMed PMID: 16239181.
110. Gabriel SR, Carmona L, Roque M, Sanchez GL, Bonfill X. Hormone replacement therapy for preventing cardiovascular disease in post-menopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005 (2):CD002229. PubMed PMID: 15846631.
111. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007 Apr 4;297(13):1465-77. PubMed PMID: 17405972.
112. Hannaford PC, Croft PR, Kay CR. Oral contraception and stroke. Evidence from the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994 May;25(5):935-42. PubMed PMID: 8165687.
113. Lidegaard O. Oral contraception and risk of a cerebral thromboembolic attack: results of a case-control study. *Bmj*. 1993 Apr 10;306(6883):956-63. PubMed PMID: 8490470. Pubmed Central PMCID: 1677472 cerebral thromboembolic attack during 1985-89 and 1588 age matched randomly selected controls were investigated. 590 case (85.3%) and 1396 control (88.1%) questionnaires were returned. Exclusions occurred for refusal to participate, unreliable diagnosis, previous thromboembolic disease, pregnancy, and a disease predisposing to a cerebral thromboembolic attack. Of the 323 cases without a known predisposition, 320 reported use or nonuse of OCs. From among the 1396 controls, 1198 nonpredisposed controls were available, among whom 1197 reported use of nonuse of OCs. Among the 320 cases, 116 (36.3%) were OC users at the time of the cerebral thromboembolic attack. By comparison, there were 191 users (16.0%) among the 1197 controls, giving a crude odds ratio of 3.0. Multivariate analysis controlled confounding factors for age, smoking, years of schooling, and use of different types of OCs during 1985-90. OCs containing 50 mcg estrogen were associated with an odds ratio for cerebral thromboembolic attack of 2.9, those containing 30-40 mcg estrogen with an odds ratio of 1.8, those containing progestogen only with an odds ratio of 0.9. A 50% increased risk of a cerebral thromboembolic attack among cigarette smokers was independent of OC status and age. Low dose OCs were associated with an increased risk of cerebral thromboembolic attack. Combined or sequential pills, containing 30-40 mcg estrogen, are associated with a one third reduced risk compared with preparations containing 50 mcg estrogen. Progestogen-only pills did not increase the risk of a cerebral thromboembolic attack.
114. Gillum LA, Mamidipudi SK, Johnston SC. Ischemic stroke risk with oral contraceptives: A meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2000 Jul 5;284(1):72-8. PubMed PMID: 10872016.
115. Johnston SC, Colford JM, Jr., Gress DR. Oral contraceptives and the risk of subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis. *Neurology*. 1998 Aug;51(2):411-8. PubMed PMID: 9710012.
116. Chan WS, Ray J, Wai EK, Ginsburg S, Hannah ME, Corey PN, et al. Risk of stroke in women exposed to low-dose oral contraceptives: a critical evaluation of the evidence. *Archives of internal medicine*. 2004 Apr 12;164(7):741-7. PubMed PMID: 15078643.
117. Martinelli I, Battaglioli T, Burgo I, Di Domenico S, Mannucci PM. Oral contraceptive use, thrombophilia and their interaction in young women with ischemic stroke. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):844-7. PubMed PMID: 16769590.
118. Siritho S, Thrift AG, McNeil JJ, You RX, Davis SM, Donnan GA, et al. Risk of ischemic stroke among users of the oral contraceptive pill: The Melbourne Risk Factor Study (MERFS)

- Group. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Jul;34(7):1575-80. PubMed PMID: 12805499.
119. Kemmeren JM, Tanis BC, van den Bosch MA, Bollen EL, Helmerhorst FM, van der Graaf Y, et al. Risk of Arterial Thrombosis in Relation to Oral Contraceptives (RATIO) study: oral contraceptives and the risk of ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002 May;33(5):1202-8. PubMed PMID: 11988591.
120. Baillargeon JP, McClish DK, Essah PA, Nestler JE. Association between the current use of low-dose oral contraceptives and cardiovascular arterial disease: a meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005 Jul;90(7):3863-70. PubMed PMID: 15814774.
121. Schwartz SM, Petitti DB, Siscovick DS, Longstreth WT, Jr., Sidney S, Raghunathan TE, et al. Stroke and use of low-dose oral contraceptives in young women: a pooled analysis of two US studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1998 Nov;29(11):2277-84. PubMed PMID: 9804634.
122. Kristensen B, Malm J, Carlberg B, Stegmayr B, Backman C, Fagerlund M, et al. Epidemiology and etiology of ischemic stroke in young adults aged 18 to 44 years in northern Sweden. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997 Sep;28(9):1702-9. PubMed PMID: 9303012.
123. James AH, Bushnell CD, Jamison MG, Myers ER. Incidence and risk factors for stroke in pregnancy and the puerperium. *Obstetrics and gynecology*. 2005 Sep;106(3):509-16. PubMed PMID: 16135580.
124. Traylor M, Farrall M, Holliday EG, Sudlow C, Hopewell JC, Cheng YC, et al. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet neurology*. 2012 Nov;11(11):951-62. PubMed PMID: 23041239. Pubmed Central PMCID: 3490334.
125. Katzmarzyk PT, Leon AS, Rankinen T, Gagnon J, Skinner JS, Wilmore JH, et al. Changes in blood lipids consequent to aerobic exercise training related to changes in body fatness and aerobic fitness. *Metabolism: clinical and experimental*. 2001 Jul;50(7):841-8. PubMed PMID: 11436192.
126. Lee CD, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Oct;34(10):2475-81. PubMed PMID: 14500932.
127. Whelton SP, Chin A, Xin X, He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of internal medicine*. 2002 Apr 2;136(7):493-503. PubMed PMID: 11926784.
128. Kohrt WM, Kirwan JP, Staten MA, Bourey RE, King DS, Holloszy JO. Insulin resistance in aging is related to abdominal obesity. *Diabetes*. 1993 Feb;42(2):273-81. PubMed PMID: 8425663.
129. Wendel-Vos GC, Schuit AJ, Feskens EJ, Boshuizen HC, Verschuren WM, Saris WH, et al. Physical activity and stroke. A meta-analysis of observational data. *International journal of epidemiology*. 2004 Aug;33(4):787-98. PubMed PMID: 15166195.
130. Hooper L, Summerbell CD, Higgins JP, Thompson RL, Clements G, Capps N, et al. Reduced or modified dietary fat for prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2000 (2):CD002137. PubMed PMID: 10796866.
131. Xu J, Eilat-Adar S, Loria C, Goldbourt U, Howard BV, Fabsitz RR, et al. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease: the Strong Heart Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Oct;84(4):894-902. PubMed PMID: 17023718.
132. Howard BV, Van Horn L, Hsia J, Manson JE, Stefanick ML, Wassertheil-Smoller S, et al. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2006 Feb 8;295(6):655-66. PubMed PMID: 16467234.
133. Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Ness AR, Moore HJ, et al. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic

review. *Bmj*. 2006 Apr 1;332(7544):752-60. PubMed PMID: 16565093. Pubmed Central PMCID: 1420708.

134. Howard BV, Manson JE, Stefanick ML, Beresford SA, Frank G, Jones B, et al. Low-fat dietary pattern and weight change over 7 years: the Women's Health Initiative Dietary Modification Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2006 Jan 4;295(1):39-49. PubMed PMID: 16391215.

135. He FJ, de Wardener HE, MacGregor GA. Salt intake and cardiovascular mortality. *The American journal of medicine*. 2007 Jan;120(1):e5; author reply e7. PubMed PMID: 17208066.

136. Hooper L, Bartlett C, Davey Smith G, Ebrahim S. Systematic review of long term effects of advice to reduce dietary salt in adults. *Bmj*. 2002 Sep 21;325(7365):628. PubMed PMID: 12242173. Pubmed Central PMCID: 126303.

137. He FJ, Nowson CA, MacGregor GA. Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):320-6. PubMed PMID: 16443039.

138. Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Neurology*. 2005 Oct 25;65(8):1193-7. PubMed PMID: 16247045.

139. Lindstrom M, Isacson SO, Merlo J. Increasing prevalence of overweight, obesity and physical inactivity: two population-based studies 1986 and 1994. *European journal of public health*. 2003 Dec;13(4):306-12. PubMed PMID: 14703316.

140. Gutierrez-Fisac JL, Regidor E, Banegas JR, Rodriguez Artalejo F. [Prevalence of obesity in the Spanish adult population: 14 years of continuous increase]. *Medicina clinica*. 2005 Feb 12;124(5):196-7. PubMed PMID: 15725372. Prevalencia de obesidad en la poblacion adulta espanola: 14 anos de incremento continuado.

141. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Archives of internal medicine*. 2002 Sep 9;162(16):1867-72. PubMed PMID: 12196085.

142. Dalkara T, Ayata C, Demirci M, Erdemli G, Onur R. Effects of cerebral ischemia on N-methyl-D-aspartate and dihydropyridine-sensitive calcium currents. An electrophysiological study in the rat hippocampus in situ. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1996 Jan;27(1):127-33. PubMed PMID: 8553388.

143. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38. PubMed PMID: 12711737.

144. Abbott RD, Behrens GR, Sharp DS, Rodriguez BL, Burchfiel CM, Ross GW, et al. Body mass index and thromboembolic stroke in nonsmoking men in older middle age. The Honolulu Heart Program. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994 Dec;25(12):2370-6. PubMed PMID: 7974575.

145. Song YM, Sung J, Davey Smith G, Ebrahim S. Body mass index and ischemic and hemorrhagic stroke: a prospective study in Korean men. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Apr;35(4):831-6. PubMed PMID: 15001798.

146. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003 Jan 8;289(2):187-93. PubMed PMID: 12517229.

147. Suk SH, Sacco RL, Boden-Albala B, Cheun JF, Pittman JG, Elkind MS, et al. Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Jul;34(7):1586-92. PubMed PMID: 12775882.

148. Folsom AR, Rasmussen ML, Chambless LE, Howard G, Cooper LS, Schmidt MI, et al. Prospective associations of fasting insulin, body fat distribution, and diabetes with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Diabetes care*. 1999 Jul;22(7):1077-83. PubMed PMID: 10388971.

149. Petty GW, Brown RD, Jr., Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Survival and recurrence after first cerebral infarction: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1975 through 1989. *Neurology*. 1998 Jan;50(1):208-16. PubMed PMID: 9443482.
150. Karapanayiotides T, Piechowski-Jozwiak B, van Melle G, Bogousslavsky J, Devuyst G. Stroke patterns, etiology, and prognosis in patients with diabetes mellitus. *Neurology*. 2004 May 11;62(9):1558-62. PubMed PMID: 15136681.
151. Megherbi SE, Milan C, Minier D, Couvreur G, Osseby GV, Tilling K, et al. Association between diabetes and stroke subtype on survival and functional outcome 3 months after stroke: data from the European BIOMED Stroke Project. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Mar;34(3):688-94. PubMed PMID: 12624292.
152. Hier DB, Foulkes MA, Swiontoniowski M, Sacco RL, Gorelick PB, Mohr JP, et al. Stroke recurrence within 2 years after ischemic infarction. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1991 Feb;22(2):155-61. PubMed PMID: 2003278.
153. Hillen T, Coshall C, Tilling K, Rudd AG, McGovern R, Wolfe CD, et al. Cause of stroke recurrence is multifactorial: patterns, risk factors, and outcomes of stroke recurrence in the South London Stroke Register. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Jun;34(6):1457-63. PubMed PMID: 12750544.
154. Amoah AG, Owusu SK, Saunders JT, Fang WL, Asare HA, Pastors JG, et al. Facilities and resources for diabetes care at regional health facilities in southern Ghana. *Diabetes research and clinical practice*. 1998 Nov;42(2):123-30. PubMed PMID: 9886749.
155. Hachinski V, Graffagnino C, Beaudry M, Bernier G, Buck C, Donner A, et al. Lipids and stroke: a paradox resolved. *Archives of neurology*. 1996 Apr;53(4):303-8. PubMed PMID: 8929151.
156. Prospective Studies C, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007 Dec 1;370(9602):1829-39. PubMed PMID: 18061058.
157. Sanossian N, Saver JL, Navab M, Ovbiagele B. High-density lipoprotein cholesterol: an emerging target for stroke treatment. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007 Mar;38(3):1104-9. PubMed PMID: 17255541.
158. Lindenstrom E, Boysen G, Nyboe J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *Bmj*. 1994 Jul 2;309(6946):11-5. PubMed PMID: 8044059. Pubmed Central PMCID: 2542648.
159. Sacco RL, Benson RT, Kargman DE, Boden-Albala B, Tuck C, Lin IF, et al. High-density lipoprotein cholesterol and ischemic stroke in the elderly: the Northern Manhattan Stroke Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001 Jun 6;285(21):2729-35. PubMed PMID: 11386928.
160. Psaty BM, Anderson M, Kronmal RA, Tracy RP, Orchard T, Fried LP, et al. The association between lipid levels and the risks of incident myocardial infarction, stroke, and total mortality: The Cardiovascular Health Study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2004 Oct;52(10):1639-47. PubMed PMID: 15450039.
161. Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD, Boland LL, Ballantyne CM, McGovern PG, et al. Plasma lipid profile and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Mar;34(3):623-31. PubMed PMID: 12624282.
162. Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis*. 2008 Feb;196(2):489-96. PubMed PMID: 17923134.
163. Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Nordestgaard BG. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2008 Nov 12;300(18):2142-52. PubMed PMID: 19001625.

164. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007 Jul 18;298(3):309-16. PubMed PMID: 17635891.
165. Li S, Zhang L, Chen T, Tian B, Deng X, Zhao Z, et al. Functional polymorphism rs189037 in the promoter region of ATM gene is associated with angiographically characterized coronary stenosis. *Atherosclerosis*. 2011 Dec;219(2):694-7. PubMed PMID: 21937043.
166. Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. *Lancet*. 2006 Sep 30;368(9542):1155-63. PubMed PMID: 17011942.
167. Amarenco P, Labreuche J, Lavalley P, Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Dec;35(12):2902-9. PubMed PMID: 15514180.
168. Cholesterol Treatment Trialists C, Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet*. 2008 Jan 12;371(9607):117-25. PubMed PMID: 18191683.
169. Iso H, Jacobs DR, Jr., Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD. Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *The New England journal of medicine*. 1989 Apr 6;320(14):904-10. PubMed PMID: 2619783.
170. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R, Albanes D, Heinonen OP. Different risk factors for different stroke subtypes: association of blood pressure, cholesterol, and antioxidants. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1999 Dec;30(12):2535-40. PubMed PMID: 10582974.
171. Zhang X, Patel A, Horibe H, Wu Z, Barzi F, Rodgers A, et al. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. *International journal of epidemiology*. 2003 Aug;32(4):563-72. PubMed PMID: 12913030.
172. Suh I, Jee SH, Kim HC, Nam CM, Kim IS, Appel LJ. Low serum cholesterol and haemorrhagic stroke in men: Korea Medical Insurance Corporation Study. *Lancet*. 2001 Mar 24;357(9260):922-5. PubMed PMID: 11289349.
173. Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet*. 2007 Jun 2;369(9576):1876-82. PubMed PMID: 17544768.
174. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10):1082-5. PubMed PMID: 10973834.
175. Ohira T, Schreiner PJ, Morrisett JD, Chambless LE, Rosamond WD, Folsom AR. Lipoprotein(a) and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Jun;37(6):1407-12. PubMed PMID: 16675734.
176. Klein JH, Hegele RA, Hackam DG, Koschinsky ML, Huff MW, Spence JD. Lipoprotein(a) is associated differentially with carotid stenosis, occlusion, and total plaque area. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Oct;28(10):1851-6. PubMed PMID: 18599799.
177. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003 May 21;289(19):2560-72. PubMed PMID: 12748199.
178. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies C. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1903-13. PubMed PMID: 12493255.

179. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 1995 Mar;25(3):305-13. PubMed PMID: 7875754.
180. Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE, Roccella EJ. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988-1994 and 1999-2004. *Hypertension*. 2008 Nov;52(5):818-27. PubMed PMID: 18852389.
181. Baskin ML, Ard J, Franklin F, Allison DB. Prevalence of obesity in the United States. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2005 Feb;6(1):5-7. PubMed PMID: 15655032.
182. Gorelick PB. Stroke prevention: windows of opportunity and failed expectations? A discussion of modifiable cardiovascular risk factors and a prevention proposal. *Neuroepidemiology*. 1997;16(4):163-73. PubMed PMID: 9267832.
183. Huang Y, Cai X, Li Y, Su L, Mai W, Wang S, et al. Prehypertension and the risk of stroke: A meta-analysis. *Neurology*. 2014 Apr 1;82(13):1153-61. PubMed PMID: 24623843.
184. Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, et al. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. *Hypertension*. 2004 Jan;43(1):10-7. PubMed PMID: 14638619.
185. Rywik SL, Davis CE, Pajak A, Broda G, Folsom AR, Kawalec E, et al. Poland and U.S. collaborative study on cardiovascular epidemiology hypertension in the community: prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Pol-MONICA Project and the U.S. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Annals of epidemiology*. 1998 Jan;8(1):3-13. PubMed PMID: 9465988.
186. Redon J, Cea-Calvo L, Lozano JV, Marti-Canales JC, Llisterri JL, Aznar J, et al. Blood pressure and estimated risk of stroke in the elderly population of Spain: the PREV-ICTUS study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007 Apr;38(4):1167-73. PubMed PMID: 17322073.
187. Redon J, Cea-Calvo L, Lozano JV, Marti-Canales JC, Llisterri JL, Aznar J, et al. Differences in blood pressure control and stroke mortality across Spain: the Prevencion de Riesgo de Ictus (PREV-ICTUS) study. *Hypertension*. 2007 Apr;49(4):799-805. PubMed PMID: 17309957.
188. Grundy SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006 Mar 21;47(6):1093-100. PubMed PMID: 16545636.
189. Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS. The association of cardiovascular risk factor clustering related to insulin resistance syndrome (Syndrome X) between young parents and their offspring: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis*. 1999 Jul;145(1):197-205. PubMed PMID: 10428311.
190. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *American journal of epidemiology*. 2000 Nov 15;152(10):897-907. PubMed PMID: 11092431.
191. Moller DE, Flier JS. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *The New England journal of medicine*. 1991 Sep 26;325(13):938-48. PubMed PMID: 1881419.
192. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes & metabolism*. 2002 Nov;28(5):364-76. PubMed PMID: 12461473.
193. Arenillas JF, Moro MA, Davalos A. The metabolic syndrome and stroke: potential treatment approaches. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007 Jul;38(7):2196-203. PubMed PMID: 17540972.
194. Bang OY, Kim JW, Lee JH, Lee MA, Lee PH, Joo IS, et al. Association of the metabolic syndrome with intracranial atherosclerotic stroke. *Neurology*. 2005 Jul 26;65(2):296-8. PubMed PMID: 16043803.

195. Ma F, Zhang H, Zhai Y, Huang W, Zhao C, Ou S, et al. Functional polymorphism -31C/G in the promoter of BIRC5 gene and risk of nasopharyngeal carcinoma among chinese. *PloS one*. 2011;6(2):e16748. PubMed PMID: 21304814. Pubmed Central PMCID: 3033414.
196. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Jan 30;49(4):403-14. PubMed PMID: 17258085.
197. Chen HJ, Bai CH, Yeh WT, Chiu HC, Pan WH. Influence of metabolic syndrome and general obesity on the risk of ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Apr;37(4):1060-4. PubMed PMID: 16514099.
198. Wiberg B, Sundstrom J, Arnlov J, Terent A, Vessby B, Zethelius B, et al. Metabolic risk factors for stroke and transient ischemic attacks in middle-aged men: a community-based study with long-term follow-up. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Dec;37(12):2898-903. PubMed PMID: 17053177.
199. Wienbergen H, Schiele R, Gitt AK, Schneider S, Heer T, Gottwik M, et al. Incidence, risk factors, and clinical outcome of stroke after acute myocardial infarction in clinical practice. MIR and MITRA Study Groups. Myocardial Infarction Registry. Maximal Individual Therapy in Acute Myocardial Infarction. *The American journal of cardiology*. 2001 Mar 15;87(6):782-5, A8. PubMed PMID: 11249905.
200. Mooe T, Eriksson P, Stegmayr B. Ischemic stroke after acute myocardial infarction. A population-based study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997 Apr;28(4):762-7. PubMed PMID: 9099193.
201. Mahaffey KW, Granger CB, Sloan MA, Thompson TD, Gore JM, Weaver WD, et al. Risk factors for in-hospital nonhemorrhagic stroke in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis: results from GUSTO-I. *Circulation*. 1998 Mar 3;97(8):757-64. PubMed PMID: 9498539.
202. Spirito P, Bellotti P, Chiarella F, Domenicucci S, Sementa A, Vecchio C. Prognostic significance and natural history of left ventricular thrombi in patients with acute anterior myocardial infarction: a two-dimensional echocardiographic study. *Circulation*. 1985 Oct;72(4):774-80. PubMed PMID: 4028378.
203. Dunkman WB, Johnson GR, Carson PE, Bhat G, Farrell L, Cohn JN. Incidence of thromboembolic events in congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation*. 1993 Jun;87(6 Suppl):VI94-101. PubMed PMID: 8500246.
204. Laupacis A, Albers G, Dunn M, Feinberg W. Antithrombotic therapy in atrial fibrillation. *Chest*. 1992 Oct;102(4 Suppl):426S-33S. PubMed PMID: 1395826.
205. Devereaux PJ, Anderson DR, Gardner MJ, Putnam W, Flowerdew GJ, Brownell BF, et al. Differences between perspectives of physicians and patients on anticoagulation in patients with atrial fibrillation: observational study. *Bmj*. 2001 Nov 24;323(7323):1218-22. PubMed PMID: 11719412. Pubmed Central PMCID: 59994.
206. Grunkemeier GL, Li HH, Naftel DC, Starr A, Rahimtoola SH. Long-term performance of heart valve prostheses. *Current problems in cardiology*. 2000 Feb;25(2):73-154. PubMed PMID: 10709140.
207. Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000 Oct;36(4):1152-8. PubMed PMID: 11028464.
208. Wood P. An appreciation of mitral stenosis. I. Clinical features. *British medical journal*. 1954 May 8;1(4870):1051-63; contd. PubMed PMID: 13149899. Pubmed Central PMCID: 2093403.
209. Coulshed N, Epstein EJ, McKendrick CS, Galloway RW, Walker E. Systemic embolism in mitral valve disease. *British heart journal*. 1970 Jan;32(1):26-34. PubMed PMID: 5417843. Pubmed Central PMCID: 487269.

210. Nishimura RA, McGoon MD, Shub C, Miller FA, Jr., Ilstrup DM, Tajik AJ. Echocardiographically documented mitral-valve prolapse. Long-term follow-up of 237 patients. *The New England journal of medicine*. 1985 Nov 21;313(21):1305-9. PubMed PMID: 4058522.
211. Avierinos JF, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd, Bailey KR, Shub C, Nishimura RA, et al. Natural history of asymptomatic mitral valve prolapse in the community. *Circulation*. 2002 Sep 10;106(11):1355-61. PubMed PMID: 12221052.
212. Marks AR, Choong CY, Sanfilippo AJ, Ferre M, Weyman AE. Identification of high-risk and low-risk subgroups of patients with mitral-valve prolapse. *The New England journal of medicine*. 1989 Apr 20;320(16):1031-6. PubMed PMID: 2927482.
213. Mattioli AV, Aquilina M, Oldani A, Longhini C, Mattioli G. Atrial septal aneurysm as a cardioembolic source in adult patients with stroke and normal carotid arteries. A multicentre study. *European heart journal*. 2001 Feb;22(3):261-8. PubMed PMID: 11161938.
214. Messe SR, Silverman IE, Kizer JR, Homma S, Zahn C, Gronseth G, et al. Practice parameter: recurrent stroke with patent foramen ovale and atrial septal aneurysm: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2004 Apr 13;62(7):1042-50. PubMed PMID: 15078999.
215. Mas JL, Arquizan C, Lamy C, Zuber M, Cabanes L, Derumeaux G, et al. Recurrent cerebrovascular events associated with patent foramen ovale, atrial septal aneurysm, or both. *The New England journal of medicine*. 2001 Dec 13;345(24):1740-6. PubMed PMID: 11742048.
216. Bousser MG, Welch KM. Relation between migraine and stroke. *Lancet neurology*. 2005 Sep;4(9):533-42. PubMed PMID: 16109360.
217. Etminan M, Takkouche B, Isorna FC, Samii A. Risk of ischaemic stroke in people with migraine: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Bmj*. 2005 Jan 8;330(7482):63. PubMed PMID: 15596418. Pubmed Central PMCID: 543862.
218. Kurth T, Slomke MA, Kase CS, Cook NR, Lee IM, Gaziano JM, et al. Migraine, headache, and the risk of stroke in women: a prospective study. *Neurology*. 2005 Mar 22;64(6):1020-6. PubMed PMID: 15781820.
219. Stang PE, Carson AP, Rose KM, Mo J, Ephross SA, Shahar E, et al. Headache, cerebrovascular symptoms, and stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Neurology*. 2005 May 10;64(9):1573-7. PubMed PMID: 15883318.
220. Palomaki H, Partinen M, Erkinjuntti T, Kaste M. Snoring, sleep apnea syndrome, and stroke. *Neurology*. 1992 Jul;42(7 Suppl 6):75-81; discussion 2. PubMed PMID: 1630643.
221. Partinen M, Palomaki H. Snoring and cerebral infarction. *Lancet*. 1985 Dec 14;2(8468):1325-6. PubMed PMID: 2866387.
222. Lee SA, Amis TC, Byth K, Larcos G, Kairaitis K, Robinson TD, et al. Heavy snoring as a cause of carotid artery atherosclerosis. *Sleep*. 2008 Sep;31(9):1207-13. PubMed PMID: 18788645. Pubmed Central PMCID: 2542975.
223. Davies DP, Rodgers H, Walshaw D, James OF, Gibson GJ. Snoring, daytime sleepiness and stroke: a case-control study of first-ever stroke. *Journal of sleep research*. 2003 Dec;12(4):313-8. PubMed PMID: 14633243.
224. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *The New England journal of medicine*. 2005 Nov 10;353(19):2034-41. PubMed PMID: 16282178.
225. Munoz R, Duran-Cantolla J, Martinez-Vila E, Gallego J, Rubio R, Aizpuru F, et al. Severe sleep apnea and risk of ischemic stroke in the elderly. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Sep;37(9):2317-21. PubMed PMID: 16888274.
226. Culebras A. Cerebrovascular disease and sleep. *Current neurology and neuroscience reports*. 2004 Mar;4(2):164-9. PubMed PMID: 14984690.
227. Hermann DM, Bassetti CL. Sleep-disordered breathing and stroke. *Current opinion in neurology*. 2003 Feb;16(1):87-90. PubMed PMID: 12544862.
228. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep*

- Heart Health Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2000 Apr 12;283(14):1829-36. PubMed PMID: 10770144.
229. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *The New England journal of medicine*. 2000 May 11;342(19):1378-84. PubMed PMID: 10805822.
230. Guilleminault C, Connolly SJ, Winkle RA. Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *The American journal of cardiology*. 1983 Sep 1;52(5):490-4. PubMed PMID: 6193700.
231. Koshino Y, Satoh M, Katayose Y, Yasuda K, Tanigawa T, Takeyasu N, et al. Association of sleep-disordered breathing and ventricular arrhythmias in patients without heart failure. *The American journal of cardiology*. 2008 Mar 15;101(6):882-6. PubMed PMID: 18328858.
232. Stevenson IH, Teichtahl H, Cunnington D, Ciavarella S, Gordon I, Kalman JM. Prevalence of sleep disordered breathing in paroxysmal and persistent atrial fibrillation patients with normal left ventricular function. *European heart journal*. 2008 Jul;29(13):1662-9. PubMed PMID: 18515807.
233. Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Oda N, Tanaka A, et al. Silent brain infarction and platelet activation in obstructive sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007 Mar 15;175(6):612-7. PubMed PMID: 17341649.
234. Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M, Sammaritano L, et al. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis and rheumatism*. 2007 Jul;56(7):2382-91. PubMed PMID: 17599766.
235. Haywood S, Liesner R, Pindora S, Ganesan V. Thrombophilia and first arterial ischaemic stroke: a systematic review. *Archives of disease in childhood*. 2005 Apr;90(4):402-5. PubMed PMID: 15781933. Pubmed Central PMCID: 1720343.
236. Brey RL, Abbott RD, Curb JD, Sharp DS, Ross GW, Stallworth CL, et al. beta(2)-Glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: the honolulu heart program. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2001 Aug;32(8):1701-6. PubMed PMID: 11486093.
237. Levine SR, Brey RL, Tilley BC, Thompson JL, Sacco RL, Sciacca RR, et al. Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004 Feb 4;291(5):576-84. PubMed PMID: 14762036.
238. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Bmj*. 2002 Nov 23;325(7374):1202. PubMed PMID: 12446535. Pubmed Central PMCID: 135491.
239. Wald DS, Wald NJ, Morris JK, Law M. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *Bmj*. 2006 Nov 25;333(7578):1114-7. PubMed PMID: 17124224. Pubmed Central PMCID: 1661741.
240. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet*. 2005 Jan 15-21;365(9455):224-32. PubMed PMID: 15652605.
241. Das RR, Seshadri S, Beiser AS, Kelly-Hayes M, Au R, Himali JJ, et al. Prevalence and correlates of silent cerebral infarcts in the Framingham offspring study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2008 Nov;39(11):2929-35. PubMed PMID: 18583555. Pubmed Central PMCID: 2712254.
242. Tanne D, Haim M, Goldbourt U, Boyko V, Doolman R, Adler Y, et al. Prospective study of serum homocysteine and risk of ischemic stroke among patients with preexisting coronary heart disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Mar;34(3):632-6. PubMed PMID: 12624283.
243. McQuillan BM, Beilby JP, Nidorf M, Thompson PL, Hung J. Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk

- determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). *Circulation*. 1999 May 11;99(18):2383-8. PubMed PMID: 10318658.
244. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *The New England journal of medicine*. 1995 Feb 2;332(5):286-91. PubMed PMID: 7816063.
245. Kelemen LE, Anand SS, Hegele RA, Stampfer MJ, Rosner B, Willett WC, et al. Associations of plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with carotid intima media thickness among South Asian, Chinese and European Canadians. *Atherosclerosis*. 2004 Oct;176(2):361-70. PubMed PMID: 15380460.
246. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 1997 Jul 24;337(4):230-6. PubMed PMID: 9227928.
247. Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, He J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2006 Dec 13;296(22):2720-6. PubMed PMID: 17164458.
248. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Feb;83(2):456S-60S. PubMed PMID: 16470012.
249. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2005 Feb 8;111(5):570-5. PubMed PMID: 15699277.
250. Garza CA, Montori VM, McConnell JP, Somers VK, Kullo IJ, Lopez-Jimenez F. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2007 Feb;82(2):159-65. PubMed PMID: 17290721.
251. Nambi V, Hoogeveen RC, Chambless L, Hu Y, Bang H, Coresh J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and high-sensitivity C-reactive protein improve the stratification of ischemic stroke risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009 Feb;40(2):376-81. PubMed PMID: 19095974. Pubmed Central PMCID: 2711777.
252. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):499-511. PubMed PMID: 12551878.
253. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *The New England journal of medicine*. 1997 Apr 3;336(14):973-9. PubMed PMID: 9077376.
254. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*. 1998 Aug 25;98(8):731-3. PubMed PMID: 9727541.
255. Fischer LM, Schlienger RG, Matter C, Jick H, Meier CR. Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2004 Jan 15;93(2):198-200. PubMed PMID: 14715346.
256. Gabriel SE. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *The American journal of medicine*. 2008 Oct;121(10 Suppl 1):S9-14. PubMed PMID: 18926169. Pubmed Central PMCID: 2858687.
257. Wolfe F, Freundlich B, Straus WL. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2003 Jan;30(1):36-40. PubMed PMID: 12508387.

258. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2001 Oct;44(10):2331-7. PubMed PMID: 11665973.
259. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997 Dec 2;96(11):4095-103. PubMed PMID: 9403635.
260. Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S, et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003 Mar 8;361(9360):809-13. PubMed PMID: 12642046.
261. Zahn R, Schneider S, Frilling B, Seidl K, Tebbe U, Weber M, et al. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation*. 2003 Mar 11;107(9):1253-9. PubMed PMID: 12628944.
262. Warren-Gash C, Smeeth L, Hayward AC. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2009 Oct;9(10):601-10. PubMed PMID: 19778762.
263. Lavalley P, Perchaud V, Gautier-Bertrand M, Grabli D, Amarenco P. Association between influenza vaccination and reduced risk of brain infarction. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002 Feb;33(2):513-8. PubMed PMID: 11823662.
264. Nichol KL, Nordin J, Mullooly J, Lask R, Fillbrandt K, Iwane M. Influenza vaccination and reduction in hospitalizations for cardiac disease and stroke among the elderly. *The New England journal of medicine*. 2003 Apr 3;348(14):1322-32. PubMed PMID: 12672859.
265. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):928-33. PubMed PMID: 11237013.
266. Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nature genetics*. 2008 Mar;40(3):340-5. PubMed PMID: 18246066.
267. International HapMap C. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1299-320. PubMed PMID: 16255080. Pubmed Central PMCID: 1880871.
268. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: a family history study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Jun;34(6):1364-9. PubMed PMID: 12714707.
269. Wood KC, Cortese-Krott MM, Kovacic JC, Noguchi A, Liu VB, Wang X, et al. Circulating Blood Endothelial Nitric Oxide Synthase Contributes to the Regulation of Systemic Blood Pressure and Nitrite Homeostasis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013 Aug;33(8):1861-71. PubMed PMID: 23702660.
270. Malik R, Bevan S, Nalls MA, Holliday EG, Devan WJ, Cheng YC, et al. Multilocus genetic risk score associates with ischemic stroke in case-control and prospective cohort studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014 Feb;45(2):394-402. PubMed PMID: 24436234.
271. Ibrahim-Verbaas CA, Fornage M, Bis JC, Choi SH, Psaty BM, Meigs JB, et al. Predicting stroke through genetic risk functions: the CHARGE Risk Score Project. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014 Feb;45(2):403-12. PubMed PMID: 24436238. Pubmed Central PMCID: 3955258.
272. Sipos L, Som A, Faust R, Richard R, Schwarz M, Ranade S, et al. Controlled delivery of paclitaxel from stent coatings using poly(hydroxystyrene-b-isobutylene-b-hydroxystyrene) and its acetylated derivative. *Biomacromolecules*. 2005 Sep-Oct;6(5):2570-82. PubMed PMID: 16153094.
273. Dichgans M, Markus HS. Genetic association studies in stroke: methodological issues and proposed standard criteria. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005 Sep;36(9):2027-31. PubMed PMID: 16051898.

274. Pollex RL, Hegele RA. Copy number variation in the human genome and its implications for cardiovascular disease. *Circulation*. 2007 Jun 19;115(24):3130-8. PubMed PMID: 17576883.
275. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *The New England journal of medicine*. 2009 Apr 23;360(17):1759-68. PubMed PMID: 19369657. Pubmed Central PMCID: 3422859.
276. Meschia JF, Nalls M, Matarin M, Brott TG, Brown RD, Jr., Hardy J, et al. Siblings with ischemic stroke study: results of a genome-wide scan for stroke loci. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011 Oct;42(10):2726-32. PubMed PMID: 21940970. Pubmed Central PMCID: 3251509.
277. Carty CL, Buzkova P, Fornage M, Franceschini N, Cole S, Heiss G, et al. Associations between incident ischemic stroke events and stroke and cardiovascular disease-related genome-wide association studies single nucleotide polymorphisms in the Population Architecture Using Genomics and Epidemiology study. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2012 Apr 1;5(2):210-6. PubMed PMID: 22403240. Pubmed Central PMCID: 3402178.
278. Meschia JF, Arnett DK, Ay H, Brown RD, Jr., Benavente OR, Cole JW, et al. Stroke Genetics Network (SiGN) Study: Design and Rationale for a Genome-Wide Association Study of Ischemic Stroke Subtypes. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Oct;44(10):2694-702. PubMed PMID: 24021684.
279. Ng PC, Kirkness EF. Whole genome sequencing. *Methods in molecular biology*. 2010;628:215-26. PubMed PMID: 20238084.
280. Falcone GJ, Biffi A, Devan WJ, Brouwers HB, Anderson CD, Valant V, et al. Burden of blood pressure-related alleles is associated with larger hematoma volume and worse outcome in intracerebral hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Feb;44(2):321-6. PubMed PMID: 23321443. Pubmed Central PMCID: 3560332.
281. Peng B, Zhu D, Ander BP, Zhang X, Xue F, Sharp FR, et al. An integrative framework for Bayesian variable selection with informative priors for identifying genes and pathways. *PLoS one*. 2013;8(7):e67672. PubMed PMID: 23844055. Pubmed Central PMCID: 3700986.
282. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. PubMed PMID: 14744438.
283. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature reviews Genetics*. 2007 Feb;8(2):93-103. PubMed PMID: 17230196.
284. Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Annals of medicine*. 2008;40(3):197-208. PubMed PMID: 18382885.
285. Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, Oh SH, Oh D, Kim OJ, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013 Feb;33(2):420-30. PubMed PMID: 23202363.
286. Wang XQ, Crutchley JL, Dostie J. Shaping the Genome with Non-Coding RNAs. *Current genomics*. 2011 Aug;12(5):307-21. PubMed PMID: 21874119. Pubmed Central PMCID: 3145261.
287. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet*. 2007 Apr 7;369(9568):1208-19. PubMed PMID: 17416265.
288. Zhang H, Sun M, Sun T, Zhang C, Meng X, Zhang Y, et al. Association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms and ischemic stroke: a meta-analysis. *Cerebrovascular diseases*. 2011;32(5):431-8. PubMed PMID: 21986569.
289. Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with coronary atherosclerosis. *American heart journal*. 1994 Dec;128(6 Pt 2):1328-32. PubMed PMID: 7977014.
290. Reynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1993 Oct 30;342(8879):1073-5. PubMed PMID: 8105309.

291. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of clinical investigation*. 1990 Oct;86(4):1343-6. PubMed PMID: 1976655. Pubmed Central PMCID: 296868.
292. Sharma P, Carter ND, Barley J, Brown MM. Molecular approach to assessing the genetic risk of cerebral infarction: deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme. *Journal of human hypertension*. 1994 Aug;8(8):645-8. PubMed PMID: 7990103.
293. Notsu Y, Nabika T, Park HY, Masuda J, Kobayashi S. Evaluation of genetic risk factors for silent brain infarction. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1999 Sep;30(9):1881-6. PubMed PMID: 10471440.
294. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH, Lindpaintner K. Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation*. 1999 Jan 26;99(3):340-3. PubMed PMID: 9918518.
295. Zhang Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, Liu X. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *PloS one*. 2012;7(10):e46495. PubMed PMID: 23049705. Pubmed Central PMCID: 3462189.
296. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007 Jan;292(1):C82-97. PubMed PMID: 16870827.
297. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, et al. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*. 1998 Nov;32(5):825-30. PubMed PMID: 9822439.
298. Alavi-Shahri J, Behravan J, Hassany M, Tatari F, Kasaian J, Ganjali R, et al. Association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and metabolic syndrome in a young female Iranian population. *Archives of medical research*. 2010 Jul;41(5):343-9. PubMed PMID: 20851291.
299. Plat AW, Stoffers HE, de Leeuw PW, van Schayck CP, Soomers FL, Kester AD, et al. The association between arterial stiffness and the angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphism is influenced by the use of cardiovascular medication. *Journal of hypertension*. 2009 Jan;27(1):69-75. PubMed PMID: 19145770.
300. Rubattu S, Di Angelantonio E, Stanzione R, Zanda B, Evangelista A, Pirisi A, et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and the risk of ischemic stroke: a role of the A1166C/AT1 gene variant. *Journal of hypertension*. 2004 Nov;22(11):2129-34. PubMed PMID: 15480097.
301. Henskens LH, Kroon AA, van Boxtel MP, Hofman PA, de Leeuw PW. Associations of the angiotensin II type 1 receptor A1166C and the endothelial NO synthase G894T gene polymorphisms with silent subcortical white matter lesions in essential hypertension. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005 Sep;36(9):1869-73. PubMed PMID: 16109907.
302. Hindorff LA, Heckbert SR, Tracy R, Tang Z, Psaty BM, Edwards KL, et al. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *American journal of hypertension*. 2002 Dec;15(12):1050-6. PubMed PMID: 12460700.
303. Brenner D, Labreuche J, Poirier O, Cambien F, Amarenco P, Investigators G. Renin-angiotensin-aldosterone system in brain infarction and vascular death. *Annals of neurology*. 2005 Jul;58(1):131-8. PubMed PMID: 15984009.
304. Gorelick PB. New horizons for stroke prevention: PROGRESS and HOPE. *Lancet neurology*. 2002 Jul;1(3):149-56. PubMed PMID: 12849483.
305. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *The Heart*

- Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. The New England journal of medicine. 2000 Jan 20;342(3):145-53. PubMed PMID: 10639539.
306. Liang X, Qiu J, Liu X, Li X, Zhao S, Wang J, et al. Polymorphism of angiotensinogen gene M235T in myocardial infarction and brain infarction: a meta-analysis. *Gene*. 2013 Oct 15;529(1):73-9. PubMed PMID: 23933419.
307. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990 Jul;87(13):5193-7. PubMed PMID: 1695013. Pubmed Central PMCID: 54288.
308. Ayata C, Ma J, Meng W, Huang P, Moskowitz MA. L-NA-sensitive rCBF augmentation during vibrissal stimulation in type III nitric oxide synthase mutant mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1996 Jul;16(4):539-41. PubMed PMID: 8964791.
309. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994 Feb 15;198(3):1027-33. PubMed PMID: 7509596.
310. Hou L, Osei-Hyiaman D, Yu H, Ren Z, Zhang Z, Wang B, et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in eNOS gene with ischemic stroke in Chinese patients. *Neurology*. 2001 Feb 27;56(4):490-6. PubMed PMID: 11222793.
311. Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PloS one*. 2011;6(9):e24266. PubMed PMID: 21912683. Pubmed Central PMCID: 3166328.
312. Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis*. 2006 Jan;184(1):193-200. PubMed PMID: 15916766.
313. Wang M, Jiang X, Wu W, Zhang D. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in Asian population: a meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(3):e60472. PubMed PMID: 23544143. Pubmed Central PMCID: 3609746.
314. Liu R, Geng P, Ma M, Yu S, Wang X, Zhang W, et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and ischemic stroke susceptibility: a meta-analysis. *The International journal of neuroscience*. 2014 Jan 16. PubMed PMID: 24325389.
315. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*. 1996 May 1;33(3):498-507. PubMed PMID: 8661009.
316. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Is paraoxonase related to atherosclerosis. *Chemico-biological interactions*. 1993 Jun;87(1-3):161-71. PubMed PMID: 8393738.
317. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Feb;24(2):216-29. PubMed PMID: 14615395.
318. Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free radical biology & medicine*. 2004 Nov 1;37(9):1317-23. PubMed PMID: 15454272.
319. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet neurology*. 2004 Apr;3(4):227-35. PubMed PMID: 15039035.
320. Carlson CS, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Richter RJ, Ranchalis J, Lewis J, et al. TagSNP analyses of the PON gene cluster: effects on PON1 activity, LDL oxidative susceptibility, and vascular disease. *Journal of lipid research*. 2006 May;47(5):1014-24. PubMed PMID: 16474172.
321. Fan AZ, Yesupriya A, Chang MH, House M, Fang J, Ned R, et al. Gene polymorphisms in association with emerging cardiovascular risk markers in adult women. *BMC medical genetics*. 2010;11:6. PubMed PMID: 20078877. Pubmed Central PMCID: 2826307.

322. Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010 Mar;24(3):931-6. PubMed PMID: 19880629.
323. van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, Jansen EH, Hattori H, Kastelein JJ, et al. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *Journal of lipid research*. 2005 Mar;46(3):445-51. PubMed PMID: 15576850.
324. Tang WH, Hartiala J, Fan Y, Wu Y, Stewart AF, Erdmann J, et al. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012 Nov;32(11):2803-12. PubMed PMID: 22982463. Pubmed Central PMCID: 3499946.
325. Michalak S, Kazmierski R, Hellmann A, Wysocka E, Kocialkowska-Adamczewska D, Wencel-Warot A, et al. Serum paraoxonase/arylesterase activity affects outcome in ischemic stroke patients. *Cerebrovascular diseases*. 2011;32(2):124-32. PubMed PMID: 21778709.
326. Lawlor DA, Day IN, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, Kiessling M, et al. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC genetics*. 2004 Jun 23;5:17. PubMed PMID: 15214960. Pubmed Central PMCID: 449704.
327. Roest M, Jansen AC, Barendrecht A, Leus FR, Kastelein JJ, Voorbij HA. Variation at the paraoxonase gene locus contributes to carotid arterial wall thickness in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clinical biochemistry*. 2005 Feb;38(2):123-7. PubMed PMID: 15642273.
328. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004 Feb 28;363(9410):689-95. PubMed PMID: 15001326.
329. Dahabreh IJ, Kitsios GD, Kent DM, Trikalinos TA. Paraoxonase 1 polymorphisms and ischemic stroke risk: A systematic review and meta-analysis. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010 Oct;12(10):606-15. PubMed PMID: 20856122. Pubmed Central PMCID: 3081717.
330. Ranade K, Kirchgessner TG, Jakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P, et al. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005 Nov;36(11):2346-50. PubMed PMID: 16239632.
331. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Nov 30;276(48):44444-9. PubMed PMID: 11579088.
332. Liu ME, Liao YC, Lin RT, Wang YS, Hsi E, Lin HF, et al. A functional polymorphism of PON1 interferes with microRNA binding to increase the risk of ischemic stroke and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013 May;228(1):161-7. PubMed PMID: 23497787.
333. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS letters*. 1991 Jul 29;286(1-2):152-4. PubMed PMID: 1650712.
334. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Apr 15;101(8):1581-90. PubMed PMID: 9541487. Pubmed Central PMCID: 508738.
335. Zhang G, Li W, Li Z, Lv H, Ren Y, Ma R, et al. Association between paraoxonase gene and stroke in the Han Chinese population. *BMC medical genetics*. 2013;14:16. PubMed PMID: 23356507. Pubmed Central PMCID: 3562169.
336. Xiao ZJ, Chen J, Sun Y, Zheng ZJ. Lack of association between the paraoxonase 1 Q/R192 single nucleotide polymorphism and stroke in a Chinese cohort. *Acta neurologica Belgica*. 2009 Sep;109(3):205-9. PubMed PMID: 19902814.

337. Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, St Clair D, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC medical genetics*. 2006;7:28. PubMed PMID: 16551349. Pubmed Central PMCID: 1435875.
338. Huang Q, Liu YH, Yang QD, Xiao B, Ge L, Zhang N, et al. Human serum paraoxonase gene polymorphisms, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population. *Neurological research*. 2006 Jul;28(5):549-54. PubMed PMID: 16808888.
339. Xu X, Li J, Sheng W, Liu L. Meta-analysis of genetic studies from journals published in China of ischemic stroke in the Han Chinese population. *Cerebrovascular diseases*. 2008;26(1):48-62. PubMed PMID: 18511872.
340. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007 Jun 8;316(5830):1491-3. PubMed PMID: 17478679.
341. Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J, et al. Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003 Feb 1;23(2):328-34. PubMed PMID: 12588779.
342. Pan JP, Lai ST, Chiang SC, Chou SC, Chiang AN. The risk of coronary artery disease in population of Taiwan is associated with Cys-Ser 311 polymorphism of human paraoxonase (PON)-2 gene. *Zhonghua yi xue za zhi = Chinese medical journal; Free China ed*. 2002 Sep;65(9):415-21. PubMed PMID: 12433026.
343. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Stranieri C, Trabetti E, Pizzolo F, et al. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *European journal of clinical investigation*. 2004 Jan;34(1):14-20. PubMed PMID: 14984433.
344. Slowik A, Wloch D, Szermer P, Wolkow P, Malecki M, Pera J, et al. Paraoxonase 2 gene C311S polymorphism is associated with a risk of large vessel disease stroke in a Polish population. *Cerebrovascular diseases*. 2007;23(5-6):395-400. PubMed PMID: 17406108.
345. Li BH, Zhang LL, Yin YW, Pi Y, Yang QW, Gao CY, et al. Association between paraoxonase 2 Ser311Cys polymorphism and ischemic stroke risk: a meta-analysis involving 5,008 subjects. *Molecular biology reports*. 2012 May;39(5):5623-30. PubMed PMID: 22183305.
346. Lazaros L, Markoula S, Kyritsis A, Georgiou I. Paraoxonase gene polymorphisms and stroke severity. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2010 May;17(5):757-9. PubMed PMID: 19930448.
347. Cozzi L, Campolo J, Parolini M, De Maria R, Patrosso MC, Marocchi A, et al. Paraoxonase 1 L55M, Q192R and paraoxonase 2 S311C alleles in atherothrombosis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013 Feb;374(1-2):233-8. PubMed PMID: 23225229.
348. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001 Dec;21(12):1876-90. PubMed PMID: 11742859.
349. Moskau S, Golla A, Grothe C, Boes M, Pohl C, Klockgether T. Heritability of carotid artery atherosclerotic lesions: an ultrasound study in 154 families. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005 Jan;36(1):5-8. PubMed PMID: 15569868.
350. Enquobahrie DA, Smith NL, Bis JC, Carty CL, Rice KM, Lumley T, et al. Cholesterol ester transfer protein, interleukin-8, peroxisome proliferator activator receptor alpha, and Toll-like receptor 4 genetic variations and risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke. *The American journal of cardiology*. 2008 Jun 15;101(12):1683-8. PubMed PMID: 18549840. Pubmed Central PMCID: 2577871.
351. Tarnoki AD, Baracchini C, Tarnoki DL, Lucatelli P, Boatta E, Zini C, et al. Evidence for a strong genetic influence on carotid plaque characteristics: an international twin study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Dec;43(12):3168-72. PubMed PMID: 23086674.
352. Gardener H, Beecham A, Cabral D, Yanuck D, Slifer S, Wang L, et al. Carotid plaque and candidate genes related to inflammation and endothelial function in Hispanics from northern

Manhattan. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011 Apr;42(4):889-96. PubMed PMID: 21393601. Pubmed Central PMCID: 3116444.

353. Gori F, Specchia C, Pietri S, Crociati L, Barlera S, Franciosi M, et al. Common genetic variants on chromosome 9p21 are associated with myocardial infarction and type 2 diabetes in an Italian population. *BMC medical genetics*. 2010;11:60. PubMed PMID: 20403154. Pubmed Central PMCID: 2871267.

354. Zhang F, Ren J, Chan K, Chen H. Angiotensin-(1-7) regulates Angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013 Jan 11;430(2):642-6. PubMed PMID: 23219836.

355. Pasmant E, Laurendeau I, Heron D, Vidaud M, Vidaud D, Bieche I. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer research*. 2007 Apr 15;67(8):3963-9. PubMed PMID: 17440112.

356. Heagerty A. Optimizing hypertension management in clinical practice. *Journal of human hypertension*. 2006 Nov;20(11):841-9. PubMed PMID: 16915300.

357. Ernst FD, Uhr K, Teumer A, Fanghanel J, Schulz S, Noack B, et al. Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort. *BMC medical genetics*. 2010;11:119. PubMed PMID: 20696043. Pubmed Central PMCID: 2924866.

358. Schaefer AS, Richter GM, Groessner-Schreiber B, Noack B, Nothnagel M, El Mokhtari NE, et al. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS genetics*. 2009 Feb;5(2):e1000378. PubMed PMID: 19214202. Pubmed Central PMCID: 2632758.

359. Holdt LM, Sass K, Gabel G, Bergert H, Thiery J, Teupser D. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15(INK4b)), CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):264-70. PubMed PMID: 20637465.

360. Ye S, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 Jul 29;52(5):378-84. PubMed PMID: 18652946.

361. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gabel G, Bergert H, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 Mar;30(3):620-7. PubMed PMID: 20056914.

362. Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, Plourde A, Matarin M, Ross-Adams H, et al. Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Annals of neurology*. 2009 May;65(5):531-9. PubMed PMID: 19475673. Pubmed Central PMCID: 2702695.

363. Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdottir S, Steinthorsdottir V, Manolescu A, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nature genetics*. 2008 Feb;40(2):217-24. PubMed PMID: 18176561.

364. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, Styrkarsdottir U, Helgadottir A, Gschwendtner A, et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Annals of neurology*. 2008 Oct;64(4):402-9. PubMed PMID: 18991354.

365. Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, Ritchie MD, Smith AV, et al. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nature genetics*. 2012 Jun;44(6):670-5. PubMed PMID: 22544366. Pubmed Central PMCID: 3366038.

366. International Stroke Genetics C, Wellcome Trust Case Control C, Bellenguez C, Bevan S, Gschwendtner A, Spencer CC, et al. Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nature genetics*. 2012 Mar;44(3):328-33. PubMed PMID: 22306652. Pubmed Central PMCID: 3303115.

367. Markus HS, Makela KM, Bevan S, Raitoharju E, Oksala N, Bis JC, et al. Evidence HDAC9 genetic variant associated with ischemic stroke increases risk via promoting carotid atherosclerosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 May;44(5):1220-5. PubMed PMID: 23449258.
368. Olesen JB, Abildstrom SZ, Erdal J, Gislason GH, Weeke P, Andersson C, et al. Effects of epilepsy and selected antiepileptic drugs on risk of myocardial infarction, stroke, and death in patients with or without previous stroke: a nationwide cohort study. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 2011 Sep;20(9):964-71. PubMed PMID: 21766386.
369. Kraft HG, Kochl S, Menzel HJ, Sandholzer C, Utermann G. The apolipoprotein (a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Human genetics*. 1992 Nov;90(3):220-30. PubMed PMID: 1336760.
370. Brunner C, Lobentanz EM, Petho-Schramm A, Ernst A, Kang C, Dieplinger H, et al. The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Dec 13;271(50):32403-10. PubMed PMID: 8943305.
371. Kraft HG, Lingenhel A, Kochl S, Hoppichler F, Kronenberg F, Abe A, et al. Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996 Jun;16(6):713-9. PubMed PMID: 8640397.
372. Myllykangas L, Polvikoski T, Sulkava R, Notkola IL, Rastas S, Verkkoniemi A, et al. Association of lipoprotein lipase Ser447Ter polymorphism with brain infarction: a population-based neuropathological study. *Annals of medicine*. 2001 Oct;33(7):486-92. PubMed PMID: 11680797.
373. Wang C, Sun T, Li H, Bai J, Li Y. Lipoprotein lipase Ser447Ter polymorphism associated with the risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Thrombosis research*. 2011 Nov;128(5):e107-12. PubMed PMID: 21816453.
374. Hopewell JC, Clarke R, Parish S, Armitage J, Lathrop M, Hager J, et al. Lipoprotein(a) genetic variants associated with coronary and peripheral vascular disease but not with stroke risk in the Heart Protection Study. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2011 Feb;4(1):68-73. PubMed PMID: 21252144.
375. Uchida Y, Sugiura S, Nakashima T, Ando F, Shimokata H. Contribution of 1425G/A polymorphism in protein kinase C-Eta (PRKCH) gene and brain white matter lesions to the risk of sudden sensorineural hearing loss in a Japanese nested case-control study. *Journal of neurogenetics*. 2011 Oct;25(3):82-7. PubMed PMID: 21756056.
376. Carmelli D, DeCarli C, Swan GE, Jack LM, Reed T, Wolf PA, et al. Evidence for genetic variance in white matter hyperintensity volume in normal elderly male twins. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1998 Jun;29(6):1177-81. PubMed PMID: 9626291.
377. Atwood LD, Wolf PA, Heard-Costa NL, Massaro JM, Beiser A, D'Agostino RB, et al. Genetic variation in white matter hyperintensity volume in the Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Jul;35(7):1609-13. PubMed PMID: 15143299.
378. Paternoster L, Chen W, Sudlow CL. Genetic determinants of white matter hyperintensities on brain scans: a systematic assessment of 19 candidate gene polymorphisms in 46 studies in 19,000 subjects. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009 Jun;40(6):2020-6. PubMed PMID: 19407234.
379. Anderson CD, Biffi A, Nalls MA, Devan WJ, Schwab K, Ayres AM, et al. Common variants within oxidative phosphorylation genes influence risk of ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Mar;44(3):612-9. PubMed PMID: 23362085. Pubmed Central PMCID: 3582722.
380. Beegle LW, Wilson MG, Abilleira F, Jordan JF, Wilson GR. A concept for NASA's Mars 2016 astrobiology field laboratory. *Astrobiology*. 2007 Aug;7(4):545-77. PubMed PMID: 17723090.

381. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. The systemic amyloidoses. *The New England journal of medicine*. 1997 Sep 25;337(13):898-909. PubMed PMID: 9302305.
382. Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET, Kelly JW. The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of molecular biology*. 2012 Aug 10;421(2-3):185-203. PubMed PMID: 22244854. Pubmed Central PMCID: 3350832.
383. Bulawa CE, Connelly S, Devit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Jun 12;109(24):9629-34. PubMed PMID: 22645360. Pubmed Central PMCID: 3386102.
384. Hornstrup LS, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetic stabilization of transthyretin, cerebrovascular disease, and life expectancy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013 Jun;33(6):1441-7. PubMed PMID: 23580146.
385. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1984 Aug 23;311(8):501-5. PubMed PMID: 6749207.
386. Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4176-83. PubMed PMID: 16144795.
387. Dehghan A, Yang Q, Peters A, Basu S, Bis JC, Rudnicka AR, et al. Association of novel genetic Loci with circulating fibrinogen levels: a genome-wide association study in 6 population-based cohorts. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2009 Apr;2(2):125-33. PubMed PMID: 20031576. Pubmed Central PMCID: 2764985.
388. Sabater-Lleal M, Huang J, Chasman D, Naitza S, Dehghan A, Johnson AD, et al. Multiethnic meta-analysis of genome-wide association studies in >100 000 subjects identifies 23 fibrinogen-associated Loci but no strong evidence of a causal association between circulating fibrinogen and cardiovascular disease. *Circulation*. 2013 Sep 17;128(12):1310-24. PubMed PMID: 23969696.
389. Olsson S, Holmegaard L, Jood K, Sjogren M, Engstrom G, Lovkvist H, et al. Genetic variation within the interleukin-1 gene cluster and ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Sep;43(9):2278-82. PubMed PMID: 22744645.
390. Nakase T, Yamazaki T, Ogura N, Suzuki A, Nagata K. The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke. *Journal of the neurological sciences*. 2008 Aug 15;271(1-2):104-9. PubMed PMID: 18479710.
391. Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007 Aug;38(8):2241-6. PubMed PMID: 17600229.
392. Banerjee I, Gupta V, Ganesh S. Association of gene polymorphism with genetic susceptibility to stroke in Asian populations: a meta-analysis. *Journal of human genetics*. 2007;52(3):205-19. PubMed PMID: 17171228.
393. Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, et al. Interleukin-10 in the brain. *Critical reviews in immunology*. 2001;21(5):427-49. PubMed PMID: 11942558.
394. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Critical care medicine*. 2003 Jan;31(1):34-8. PubMed PMID: 12544990.
395. Reiner AP, Wurfel MM, Lange LA, Carlson CS, Nord AS, Carty CL, et al. Polymorphisms of the IL1-receptor antagonist gene (IL1RN) are associated with multiple markers of systemic inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Jul;28(7):1407-12. PubMed PMID: 18451331. Pubmed Central PMCID: 2748384.

396. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Forte GI, Casuccio A, Vaccarino L, Scola L, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of pro-inflammatory/anti-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic genes in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtype. *Cytokine*. 2012 Jun;58(3):398-405. PubMed PMID: 22425140.
397. Balding J, Livingstone WJ, Pittock SJ, Mynett-Johnson L, Ahern T, Hodgson A, et al. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Irish journal of medical science*. 2004 Oct-Dec;173(4):200-3. PubMed PMID: 16323614.
398. Greisenegger S, Endler G, Haering D, Schillinger M, Lang W, Lalouschek W, et al. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events. *Thrombosis research*. 2003 Jun 1;110(4):181-6. PubMed PMID: 14512079.
399. Pola R, Flex A, Gaetani E, Flore R, Serricchio M, Pola P. Synergistic effect of -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Apr;34(4):881-5. PubMed PMID: 12637697.
400. Munshi A, Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Alshatwi AA, Shafi G, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-3 gene variants with stroke. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2011 Aug;18(8):1053-9. PubMed PMID: 21219546.
401. Kaplan RC, Smith NL, Zucker S, Heckbert SR, Rice K, Psaty BM. Matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and MMP9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke, and hemorrhagic stroke. *Atherosclerosis*. 2008 Nov;201(1):130-7. PubMed PMID: 18342317. Pubmed Central PMCID: 3077423.
402. Ozaki K, Sato H, Inoue K, Tsunoda T, Sakata Y, Mizuno H, et al. SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. *Nature genetics*. 2009 Mar;41(3):329-33. PubMed PMID: 19198608.
403. Tsai PC, Liao YC, Lin TH, Hsi E, Yang YH, Juo SH. Additive effect of ANRIL and BRAP polymorphisms on ankle-brachial index in a Taiwanese population. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2012;76(2):446-52. PubMed PMID: 22122968.
404. Liao YC, Wang YS, Guo YC, Ozaki K, Tanaka T, Lin HF, et al. BRAP Activates Inflammatory Cascades and Increases the Risk for Carotid Atherosclerosis. *Molecular medicine*. 2011 Sep-Oct;17(9-10):1065-74. PubMed PMID: 21670849. Pubmed Central PMCID: 3188876.
405. Liao YC, Lin HF, Guo YC, Chen CH, Huang ZZ, Juo SH, et al. Lack of association between a functional variant of the BRCA-1 related associated protein (BRAP) gene and ischemic stroke. *BMC medical genetics*. 2013;14:17. PubMed PMID: 23356535. Pubmed Central PMCID: 3564782.
406. Wang X, Cheng S, Brophy VH, Erlich HA, Mannhalter C, Berger K, et al. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009 Mar;40(3):683-95. PubMed PMID: 19131662. Pubmed Central PMCID: 2757095.
407. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ, Euro CI. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007 Dec;27(12):2783-9. PubMed PMID: 17932316.
408. Williams FM, Carter AM, Hysi PG, Surdulescu G, Hodgkiss D, Soranzo N, et al. Ischemic stroke is associated with the ABO locus: the EuroCLOT study. *Annals of neurology*. 2013 Jan;73(1):16-31. PubMed PMID: 23381943. Pubmed Central PMCID: 3582024.
409. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994 May 5;369(6475):64-7. PubMed PMID: 8164741.
410. Deschiens MA, Conard J, Horellou MH, Ameri A, Preter M, Chedru F, et al. Coagulation studies, factor V Leiden, and anticardiolipin antibodies in 40 cases of cerebral venous

thrombosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1996 Oct;27(10):1724-30. PubMed PMID: 8841318.

411. Hillier CE, Collins PW, Bowen DJ, Bowley S, Wiles CM. Inherited prothrombotic risk factors and cerebral venous thrombosis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 1998 Oct;91(10):677-80. PubMed PMID: 10024925.

412. Hankey GJ, Eikelboom JW, van Bockxmeer FM, Lofthouse E, Staples N, Baker RI. Inherited thrombophilia in ischemic stroke and its pathogenic subtypes. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2001 Aug;32(8):1793-9. PubMed PMID: 11486107.

413. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Kofoed S, Jensen G, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart Study and 2 meta-analyses. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):3-10. PubMed PMID: 12070000.

414. Weber M, Hayem G, DeBandt M, Palazzo E, Roux S, Kahn MF, et al. The family history of patients with primary or secondary antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus*. 2000;9(4):258-63. PubMed PMID: 10866096.

415. Goldberg SN, Conti-Kelly AM, Greco TP. A family study of anticardiolipin antibodies and associated clinical conditions. *The American journal of medicine*. 1995 Nov;99(5):473-9. PubMed PMID: 7485203.

416. Pezzini A, Del Zotto E, Magoni M, Costa A, Archetti S, Grassi M, et al. Inherited thrombophilic disorders in young adults with ischemic stroke and patent foramen ovale. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003 Jan;34(1):28-33. PubMed PMID: 12511746.

417. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine*. 2008 Aug 28;359(9):938-49. PubMed PMID: 18753650.

418. Attia J, Thakkestian A, Wang Y, Lincz L, Parsons M, Sturm J, et al. The PAI-1 4G/5G gene polymorphism and ischemic stroke: an association study and meta-analysis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2007 Jul-Aug;16(4):173-9. PubMed PMID: 17689414.

419. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsiara CG, Kapsimali V, Travlou A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2007 Jul;18(5):497-504. PubMed PMID: 17581326.

420. Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, Emeis JJ. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *International journal of hematology*. 1994 Jun;59(4):233-55. PubMed PMID: 8086618.

421. Ladenvall P, Johansson L, Jansson JH, Jern S, Nilsson TK, Tjarnlund A, et al. Tissue-type plasminogen activator -7,351C/T enhancer polymorphism is associated with a first myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*. 2002 Jan;87(1):105-9. PubMed PMID: 11848437.

422. Jannes J, Hamilton-Bruce MA, Pilotto L, Smith BJ, Mullighan CG, Bardy PG, et al. Tissue plasminogen activator -7351C/T enhancer polymorphism is a risk factor for lacunar stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 May;35(5):1090-4. PubMed PMID: 15031453.

423. Sun X, Lai R, Li J, Luo M, Wang Y, Sheng W. The -7351C/T polymorphism in the TPA gene and ischemic stroke risk: a meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(1):e53558. PubMed PMID: 23326456. Pubmed Central PMCID: 3541142.

424. Ladenvall P, Wall U, Jern S, Jern C. Identification of eight novel single-nucleotide polymorphisms at human tissue-type plasminogen activator (t-PA) locus: association with vascular t-PA release in vivo. *Thrombosis and haemostasis*. 2000 Aug;84(2):150-5. PubMed PMID: 10959683.

425. Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, et al. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):2010-4. PubMed PMID: 9490684.

426. Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE, et al. Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII

- activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2000 Oct 24;102(17):2058-62. PubMed PMID: 11044420.
427. Braat EA, Dooijewaard G, Rijken DC. Fibrinolytic properties of activated FXII. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999 Aug;263(3):904-11. PubMed PMID: 10469157.
428. Santamaria A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Marti-Fabregas J, et al. Homozygosity of the T allele of the 46 C->T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for ischemic stroke in the Spanish population. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Aug;35(8):1795-9. PubMed PMID: 15232129.
429. Romisch J, Feussner A, Vermohlen S, Stohr HA. A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1999 Dec;10(8):471-9. PubMed PMID: 10636458.
430. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007 Jun;5(6):1097-105. PubMed PMID: 17567444.
431. Heywood DM, Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Polymorphisms of the factor VII gene and circulating FVII:C levels in relation to acute cerebrovascular disease and poststroke mortality. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997 Apr;28(4):816-21. PubMed PMID: 9099202.
432. Lopaciuk S, Windyga J, Watala CW, Bykowska K, Pietrucha T, Kwiecinski H, et al. Polymorphisms in the factor VII gene and ischemic stroke in young adults. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2010 Jul;21(5):442-7. PubMed PMID: 20453637.
433. Touze E, Rothwell PM. Heritability of ischaemic stroke in women compared with men: a genetic epidemiological study. *Lancet neurology*. 2007 Feb;6(2):125-33. PubMed PMID: 17239799.
434. Russell MB, Iselius L, Olesen J. Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis. *Human genetics*. 1995 Dec;96(6):726-30. PubMed PMID: 8522335.
435. Russell MB, Hilden J, Sorensen SA, Olesen J. Familial occurrence of migraine without aura and migraine with aura. *Neurology*. 1993 Jul;43(7):1369-73. PubMed PMID: 8392151.
436. Griffiths LR, Nyholt DR, Curtain RP, Goadsby PJ, Brimage PJ. Migraine association and linkage studies of an endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphism. *Neurology*. 1997 Aug;49(2):614-7. PubMed PMID: 9270610.
437. Borroni B, Rao R, Liberini P, Venturelli E, Cossandi M, Archetti S, et al. Endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) polymorphism is an independent risk factor for migraine with aura. *Headache*. 2006 Nov-Dec;46(10):1575-9. PubMed PMID: 17115991.
438. Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, Nicaud V, Bousser MG, Alperovitch A. Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA -231 A/G) gene polymorphism. *Neurology*. 2001 May 22;56(10):1273-7. PubMed PMID: 11376172.
439. MacClellan LR, Howard TD, Cole JW, Stine OC, Giles WH, O'Connell JR, et al. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine and stroke: the Stroke Prevention in Young Women study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009 Oct;40(10):e550-7. PubMed PMID: 19661472. Pubmed Central PMCID: 2753702.
440. Kurth T, Gaziano JM, Cook NR, Logroscino G, Diener HC, Buring JE. Migraine and risk of cardiovascular disease in women. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2006 Jul 19;296(3):283-91. PubMed PMID: 16849661.
441. Diener HC, Kurth T. Is migraine a risk factor for stroke? *Neurology*. 2005 May 10;64(9):1496-7. PubMed PMID: 15883306.
442. Kruit MC, van Buchem MA, Hofman PA, Bakkers JT, Terwindt GM, Ferrari MD, et al. Migraine as a risk factor for subclinical brain lesions. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004 Jan 28;291(4):427-34. PubMed PMID: 14747499.

443. Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel A, Nibbio A, Nagy TG, et al. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet*. 1995 Oct 7;346(8980):934-9. PubMed PMID: 7564728.
444. Opherck C, Gonik M, Duering M, Malik R, Jouvent E, Herve D, et al. Genome-Wide Genotyping Demonstrates a Polygenic Risk Score Associated With White Matter Hyperintensity Volume in CADASIL. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014 Apr;45(4):968-72. PubMed PMID: 24578207.
445. Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, et al. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *The New England journal of medicine*. 2009 Apr 23;360(17):1729-39. PubMed PMID: 19387015.
446. Durlach J. A possible advance in arterial gene therapy for aortic complications in the Marfan syndrome by local transfer of an antisense Mg-dependent hammerhead ribozyme. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 2001 Mar;14(1-2):65-7. PubMed PMID: 11300623.
447. Marsh JN, Hu G, Scott MJ, Zhang H, Goette MJ, Gaffney PJ, et al. A fibrin-specific thrombolytic nanomedicine approach to acute ischemic stroke. *Nanomedicine*. 2011 Jun;6(4):605-15. PubMed PMID: 21506686. Pubmed Central PMCID: 3698856.
448. Desnick RJ, Banikazemi M. Fabry disease: clinical spectrum and evidence-based enzyme replacement therapy. *Nephrologie & therapeutique*. 2006 Jan;2 Suppl 2:S172-85. PubMed PMID: 17373219.
449. Debette S, Markus HS. The genetics of cervical artery dissection: a systematic review. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009 Jun;40(6):e459-66. PubMed PMID: 19390073.
450. Smith ER, Scott RM. Moyamoya: epidemiology, presentation, and diagnosis. *Neurosurgery clinics of North America*. 2010 Jul;21(3):543-51. PubMed PMID: 20561502.
451. Guo DC, Papke CL, Tran-Fadulu V, Regalado ES, Avidan N, Johnson RJ, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *American journal of human genetics*. 2009 May;84(5):617-27. PubMed PMID: 19409525. Pubmed Central PMCID: 2680995.
452. Miyawaki S, Imai H, Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Saito N. Identification of a genetic variant common to moyamoya disease and intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Dec;43(12):3371-4. PubMed PMID: 23010677.
453. Woo D, Sekar P, Chakraborty R, Haverbusch MA, Flaherty ML, Kissela BM, et al. Genetic epidemiology of intracerebral hemorrhage. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2005 Nov-Dec;14(6):239-43. PubMed PMID: 16557295. Pubmed Central PMCID: 1615714.
454. Devan WJ, Falcone GJ, Anderson CD, Jagiella JM, Schmidt H, Hansen BM, et al. Heritability estimates identify a substantial genetic contribution to risk and outcome of intracerebral hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Jun;44(6):1578-83. PubMed PMID: 23559261. Pubmed Central PMCID: 3684199.
455. Ferro JM, Canhao P, Stam J, Bousser MG, Barinagarrementeria F, Investigators I. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis: results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT). *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Mar;35(3):664-70. PubMed PMID: 14976332.
456. Wysokinska EM, Wysokinski WE, Brown RD, Karnicki K, Gosk-Beirska I, Grill D, et al. Thrombophilia differences in cerebral venous sinus and lower extremity deep venous thrombosis. *Neurology*. 2008 Feb 19;70(8):627-33. PubMed PMID: 18285537.
457. Carrio I, Estorch M, Berna L, Lopez-Pousa J, Tabernero J, Torres G. Indium-111-antimyosin and iodine-123-MIBG studies in early assessment of doxorubicin cardiotoxicity. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1995 Nov;36(11):2044-9. PubMed PMID: 7472595.

458. de Bruijn SF, Stam J, Koopman MM, Vandenbroucke JP. Case-control study of risk of cerebral sinus thrombosis in oral contraceptive users and in [correction of who are] carriers of hereditary prothrombotic conditions. The Cerebral Venous Sinus Thrombosis Study Group. *Bmj*. 1998 Feb 21;316(7131):589-92. PubMed PMID: 9518910. Pubmed Central PMCID: 28462.
459. Guimaraes J, Azevedo E. Phytoestrogens as a risk factor for cerebral sinus thrombosis. *Cerebrovascular diseases*. 2005;20(2):137-8. PubMed PMID: 16006763.
460. Costa P, Del Zotto E, Giossi A, Volonghi I, Poli L, Frigerio M, et al. Headache due to spontaneous intracranial hypotension and subsequent cerebral vein thrombosis. *Headache*. 2012 Nov;52(10):1592-6. PubMed PMID: 23046074.
461. De Cruz P, Lust M, Trost N, Wall A, Gerraty R, Connell WR. Cerebral venous thrombosis associated with ulcerative colitis. *Internal medicine journal*. 2008 Nov;38(11):865-7. PubMed PMID: 19120538.
462. Marjot T, Yadav S, Hasan N, Bentley P, Sharma P. Genes associated with adult cerebral venous thrombosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011 Apr;42(4):913-8. PubMed PMID: 21350198.
463. Cloft HJ, Kallmes DF, Kallmes MH, Goldstein JH, Jensen ME, Dion JE. Prevalence of cerebral aneurysms in patients with fibromuscular dysplasia: a reassessment. *Journal of neurosurgery*. 1998 Mar;88(3):436-40. PubMed PMID: 9488296.
464. Foroud T, Koller DL, Lai D, Sauerbeck L, Anderson C, Ko N, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms confirms role of Anril and SOX17 in disease risk. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Nov;43(11):2846-52. PubMed PMID: 22961961. Pubmed Central PMCID: 3752852.
465. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine*. 2012 Dec 20;367(25):2407-18. PubMed PMID: 23121377. Pubmed Central PMCID: 3760207.
466. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low SK, Kirschek B, Auburger G, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nature genetics*. 2010 May;42(5):420-5. PubMed PMID: 20364137. Pubmed Central PMCID: 2861730.
467. Yasuno K, Bakircioglu M, Low SK, Bilguvar K, Gaal E, Ruigrok YM, et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Dec 6;108(49):19707-12. PubMed PMID: 22106312. Pubmed Central PMCID: 3241810.
468. Deka R, Koller DL, Lai D, Indugula SR, Sun G, Woo D, et al. The relationship between smoking and replicated sequence variants on chromosomes 8 and 9 with familial intracranial aneurysm. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010 Jun;41(6):1132-7. PubMed PMID: 20190001. Pubmed Central PMCID: 2876230.
469. Hashikata H, Liu W, Inoue K, Mineharu Y, Yamada S, Nanayakkara S, et al. Confirmation of an association of single-nucleotide polymorphism rs1333040 on 9p21 with familial and sporadic intracranial aneurysms in Japanese patients. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010 Jun;41(6):1138-44. PubMed PMID: 20395613.
470. Hussain I, Duffis EJ, Gandhi CD, Prestigiacomo CJ. Genome-wide association studies of intracranial aneurysms: an update. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Sep;44(9):2670-5. PubMed PMID: 23908070.
471. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *The New England journal of medicine*. 2011 Mar 24;364(12):1144-53. PubMed PMID: 21428770. Pubmed Central PMCID: 3184612.
472. Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: a prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Archives of internal medicine*. 2007 Jul 9;167(13):1414-9. PubMed PMID: 17620536.
473. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G, et al. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-

- Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):160S-98S. PubMed PMID: 18574265.
474. Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, DJ OK, Xia F, Verbrugge RR, et al. Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). *Journal of the American College of Cardiology*. 2010 Jun 22;55(25):2804-12. PubMed PMID: 20381283.
475. Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, Brensinger CM, Kimmel SE. Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Feb 1;57(5):612-8. PubMed PMID: 21272753. Pubmed Central PMCID: 3107000.
476. Pare G, Eriksson N, Lehr T, Connolly S, Eikelboom J, Ezekowitz MD, et al. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding. *Circulation*. 2013 Apr 2;127(13):1404-12. PubMed PMID: 23467860.
477. Maitland-van der Zee AH, Klungel OH, Stricker BH, Monique Verschuren WM, Kastelein JJ, Leufkens HG, et al. Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*. 2002 Aug;163(2):213-22. PubMed PMID: 12052467.
478. Schmitz G, Schmitz-Madry A, Ugocsai P. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Current opinion in lipidology*. 2007 Apr;18(2):164-73. PubMed PMID: 17353665.
479. Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP, Jr., Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004 Jun 16;291(23):2821-7. PubMed PMID: 15199031.
480. Group SC, Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *The New England journal of medicine*. 2008 Aug 21;359(8):789-99. PubMed PMID: 18650507.
481. Woo D, Deka R, Falcone GJ, Flaherty ML, Haverbusch M, Martini SR, et al. Apolipoprotein E, Statins, and Risk of Intracerebral Hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2013 Sep 5. PubMed PMID: 24008570.
482. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *The New England journal of medicine*. 2009 Jan 22;360(4):354-62. PubMed PMID: 19106084.
483. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *The New England journal of medicine*. 2009 Jan 22;360(4):363-75. PubMed PMID: 19106083.
484. Li X, Zhang L, Chen X, Qu F, Li J, Ma C, et al. PON1 Q192R genotype influences clopidogrel responsiveness by relative platelet inhibition instead of on-treatment platelet reactivity. *Thrombosis research*. 2013 Oct;132(4):444-9. PubMed PMID: 23993903.
485. Alvarez-Sabin J, Maisterra O, Santamarina E, Kase CS. Factors influencing haemorrhagic transformation in ischaemic stroke. *Lancet neurology*. 2013 Jul;12(7):689-705. PubMed PMID: 23726850.
486. del Rio-Espinola A, Fernandez-Cadenas I, Giralt D, Quiroga A, Gutierrez-Agullo M, Quintana M, et al. A predictive clinical-genetic model of tissue plasminogen activator response in acute ischemic stroke. *Annals of neurology*. 2012 Nov;72(5):716-29. PubMed PMID: 23280790.
487. Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon FJ, Hernandez-Perera O, Fiuza-Perez MD, Anabitarte-Prieto A, Losada-Cabrera A. Effects of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variants on blood pressure and other vascular risk factors in a Spanish population. *Journal of human hypertension*. 2000 Dec;14(12):789-93. PubMed PMID: 11114694.
488. Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon F, Hernandez-Perera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A, et al. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *Prospective Cardiac Gene*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001 May;37(6):1536-42. PubMed PMID: 11345362.

489. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988 Feb 11;16(3):1215. PubMed PMID: 3344216. Pubmed Central PMCID: 334765.
490. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*. 1995 May;10(1):111-3. PubMed PMID: 7647779.
491. Humbert R, Adler DA, Distechi CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature genetics*. 1993 Jan;3(1):73-6. PubMed PMID: 8098250.
492. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *American journal of human genetics*. 1998 Jan;62(1):36-44. PubMed PMID: 9443862. Pubmed Central PMCID: 1376796.
493. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Arai K, Kumon Y, et al. Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1996 Sep 6;125(2):161-9. PubMed PMID: 8842348.
494. Diaz-Guzman J, Egado JA, Gabriel-Sanchez R, Barbera-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernandez-Perez C, et al. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovascular diseases*. 2012;34(4):272-81. PubMed PMID: 23095851.
495. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *The New England journal of medicine*. 1994 Apr 14;330(15):1041-6. PubMed PMID: 8127331.
496. Clayton D, McKeigue PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet*. 2001 Oct 20;358(9290):1356-60. PubMed PMID: 11684236.
497. Macias-Reyes A, Rodriguez-Esparragon F, Caballero-Hidalgo A, Hernandez-Trujillo Y, Medina A, Rodriguez-Perez JC. Insight into the role of CYBA A640G and C242T gene variants and coronary heart disease risk. A case-control study. *Free radical research*. 2008 Jan;42(1):82-92. PubMed PMID: 18324526.
498. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2008 Dec;59 Suppl 9:155-67. PubMed PMID: 19261978.
499. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nature genetics*. 1994 Aug;7(4):551. PubMed PMID: 7951330.
500. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *American journal of human genetics*. 1995 May;56(5):1052-9. PubMed PMID: 7726158. Pubmed Central PMCID: 1801446.
501. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American journal of human genetics*. 1998 May;62(5):1044-51. PubMed PMID: 9545395. Pubmed Central PMCID: 1377082.
502. Arsene D, Gaina G, Balescu C, Ardeleanu C. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms as factors involved in ischemic stroke. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2011;52(4):1203-7. PubMed PMID: 22203923.
503. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *American journal of human genetics*. 1991 Mar;48(3):536-45. PubMed PMID: 1998339. Pubmed Central PMCID: 1682970.

504. Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2006 Apr 13;354(15):1578-88. PubMed PMID: 16531614.
505. Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, Cooper J, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet*. 2011 Aug 13;378(9791):584-94. PubMed PMID: 21803414. Pubmed Central PMCID: 3156981.
506. Ward M, Wilson CP, Strain JJ, Horigan G, Scott JM, McNulty H. B-vitamins, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and hypertension. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2011 Jul;81(4):240-4. PubMed PMID: 22237773.
507. Kullo IJ, Ding K, Boerwinkle E, Turner ST, Mosley TH, Jr., Kardia SL, et al. Novel genomic loci influencing plasma homocysteine levels. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006 Jul;37(7):1703-9. PubMed PMID: 16741189.
508. Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, Ordonez-Llanos J, et al. A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *American journal of human genetics*. 2005 Jun;76(6):925-33. PubMed PMID: 15849667. Pubmed Central PMCID: 1196452.
509. Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ. Genetics of hyperhomocysteinaemia in cardiovascular disease. *Annals of clinical biochemistry*. 2003 Jan;40(Pt 1):46-59. PubMed PMID: 12542910.
510. Low HQ, Chen CP, Kasiman K, Thalamuthu A, Ng SS, Foo JN, et al. A comprehensive association analysis of homocysteine metabolic pathway genes in Singaporean Chinese with ischemic stroke. *PloS one*. 2011;6(9):e24757. PubMed PMID: 21935458. Pubmed Central PMCID: 3174208.
511. Skovby F, Krassikoff N, Francke U. Assignment of the gene for cystathionine beta-synthase to human chromosome 21 in somatic cell hybrids. *Human genetics*. 1984;65(3):291-4. PubMed PMID: 6583157.
512. Kluijtmans LA, Boers GH, Stevens EM, Renier WO, Kraus JP, Trijbels FJ, et al. Defective cystathionine beta-synthase regulation by S-adenosylmethionine in a partially pyridoxine responsive homocystinuria patient. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Jul 15;98(2):285-9. PubMed PMID: 8755636. Pubmed Central PMCID: 507429.
513. Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Fowler B, Bakkeren JA, Schoonderwaldt HC, et al. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *The New England journal of medicine*. 1985 Sep 19;313(12):709-15. PubMed PMID: 4033695.
514. Della-Morte D, Beecham A, Rundek T, Slifer S, Boden-Albala B, McClendon MS, et al. Genetic linkage of serum homocysteine in Dominican families: the Family Study of Stroke Risk and Carotid Atherosclerosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010 Jul;41(7):1356-62. PubMed PMID: 20489178. Pubmed Central PMCID: 2914470.
515. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. *American journal of human genetics*. 2009 Apr;84(4):477-82. PubMed PMID: 19303062. Pubmed Central PMCID: 2667971.
516. Splaver A, Lamas GA, Hennekens CH. Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *American heart journal*. 2004 Jul;148(1):34-40. PubMed PMID: 15215789.

517. Signorello MG, Segantin A, Passalacqua M, Leoncini G. Homocysteine decreases platelet NO level via protein kinase C activation. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2009 Mar;20(2):104-13. PubMed PMID: 19100855.
518. Sen S, Reddy PL, Grewal RP, Busby M, Chang P, Hinderliter A. Hyperhomocysteinemia is Associated with Aortic Atheroma Progression in Stroke/TIA Patients. *Frontiers in neurology*. 2010;1:131. PubMed PMID: 21188261. Pubmed Central PMCID: 3008913.
519. Moller J, Nielsen GM, Tvedegaard KC, Andersen NT, Jorgensen PE. A meta-analysis of cerebrovascular disease and hyperhomocysteinaemia. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2000 Oct;60(6):491-9. PubMed PMID: 11129065.
520. Sacco RL, Anand K, Lee HS, Boden-Albala B, Stabler S, Allen R, et al. Homocysteine and the risk of ischemic stroke in a triethnic cohort: the NORthern MANhattan Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004 Oct;35(10):2263-9. PubMed PMID: 15345803.
521. Kang S, Zhao X, Liu L, Wu W, Zhang D. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with hemorrhagic stroke: a meta-analysis. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013 May;17(5):412-7. PubMed PMID: 23428159. Pubmed Central PMCID: 3634136.
522. Li P, Qin C. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and susceptibility to ischemic stroke: a meta-analysis. *Gene*. 2014 Feb 10;535(2):359-64. PubMed PMID: 24140489.
523. Kim OJ, Hong SH, Jeon YJ, Oh SH, Kim HS, Park YS, et al. Gene-environment interactions between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and metabolic syndrome for the prevalence of ischemic stroke in Koreans. *Neuroscience letters*. 2013 Jan 15;533:11-6. PubMed PMID: 23201630.
524. They-They TP, Battas O, Nadifi S. Synergistic effect of MTHFR C677T and F2 G20210A polymorphisms on ischemic stroke. *Neuroscience bulletin*. 2013 Dec;29(6):725-30. PubMed PMID: 24132798.
525. Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*. 2001 Oct;121(4):784-91. PubMed PMID: 11606491.
526. Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Jr., Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Experimental gerontology*. 2004 Jan;39(1):59-66. PubMed PMID: 14724065.
527. van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, et al. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 1999 Dec;147(2):405-10. PubMed PMID: 10559527.
528. Rao MN, Marmillot P, Gong M, Palmer DA, Seeff LB, Strader DB, et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003 Oct;52(10):1287-94. PubMed PMID: 14564680.
529. Kordonouri O, James RW, Bennetts B, Chan A, Kao YL, Danne T, et al. Modulation by blood glucose levels of activity and concentration of paraoxonase in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*. 2001 Jun;50(6):657-60. PubMed PMID: 11398141.
530. Azizi F, Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Rahmani M, Arabi M. Serum paraoxonase 1 activity is decreased in thyroid dysfunction. *Journal of endocrinological investigation*. 2003 Aug;26(8):703-9. PubMed PMID: 14669822.
531. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, Ohkubo S, Ikeda Y, Nishiya K, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life sciences*. 2003 May 9;72(25):2877-85. PubMed PMID: 12697270.

532. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, Merle L, Marquet P, Lachatre G, et al. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1998 Nov;9(11):2082-8. PubMed PMID: 9808094.
533. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2002 Apr;252(2):63-7. PubMed PMID: 12111338.
534. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001 Apr;21(4):473-80. PubMed PMID: 11304460.
535. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002 Jun;33(6):1459-64. PubMed PMID: 12052975.
536. Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F, Kapeller P, Roob G, Lechner A, et al. MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms : three-year follow-up of the austrian stroke prevention study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000 Jul;20(7):1811-6. PubMed PMID: 10894822.
537. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, et al. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1998 Aug;139(2):341-9. PubMed PMID: 9712341.
538. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000 May 16;101(19):2252-7. PubMed PMID: 10811591.
539. Salonen JT, Malin R, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Lakka TA, Lehtimaki T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *Bmj*. 1999 Aug 21;319(7208):487-9; discussion 90. PubMed PMID: 10454401. Pubmed Central PMCID: 28201.
540. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Gradert A, Schumacher M, Watzinger N, et al. Paraoxonase PON1 polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1998 Oct;29(10):2043-8. PubMed PMID: 9756579.
541. Bonafe M, Marchegiani F, Cardelli M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, et al. Genetic analysis of Paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *European journal of human genetics : EJHG*. 2002 May;10(5):292-6. PubMed PMID: 12082503.
542. Christiansen L, Bathum L, Frederiksen H, Christensen K. Paraoxonase 1 polymorphisms and survival. *European journal of human genetics : EJHG*. 2004 Oct;12(10):843-7. PubMed PMID: 15241482.
543. Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000 Sep;20(9):2120-6. PubMed PMID: 10978258.
544. Luu HN, Kingah PL, North K, Boerwinkle E, Volcik KA. Interaction of folate intake and the paraoxonase Q192R polymorphism with risk of incident coronary heart disease and ischemic stroke: the atherosclerosis risk in communities study. *Annals of epidemiology*. 2011 Nov;21(11):815-23. PubMed PMID: 21982484. Pubmed Central PMCID: 3190162.
545. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001 Sep;21(9):1451-7. PubMed PMID: 11557671.

546. Shenhar-Tsarfaty S, Waiskopf N, Ofek K, Shopin L, Usher S, Berliner S, et al. Atherosclerosis and arteriosclerosis parameters in stroke patients associate with paraoxonase polymorphism and esterase activities. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2013 Jun;20(6):891-8. PubMed PMID: 23305304.
547. Liu H, Xia P, Liu M, Ji XM, Sun HB, Tao L, et al. PON gene polymorphisms and ischaemic stroke: a systematic review and meta analysis. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2013 Feb;8(2):111-23. PubMed PMID: 22631428.
548. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000 Nov;20(11):2441-7. PubMed PMID: 11073850.
549. Moghtaderi A, Hashemi M, Dabiri S, Moazeni-Roodi A, Hosseini M. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lacunar infarction: a case control study. *Clinical biochemistry*. 2011 Mar;44(4):288-92. PubMed PMID: 21167145.
550. Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Aug 14;104(33):13513-8. PubMed PMID: 17686970. Pubmed Central PMCID: 1948927.
551. Kalita J, Somarajan BI, Kumar B, Mittal B, Misra UK. A study of ACE and ADD1 polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011 Mar 18;412(7-8):642-6. PubMed PMID: 21194526.
552. Schelleman H, Klungel OH, Witteman JC, Breteler MM, Hofman A, van Duijn CM, et al. Interaction between polymorphisms in the renin-angiotensin-system and angiotensin-converting enzyme inhibitor or beta-blocker use and the risk of myocardial infarction and stroke. *The pharmacogenomics journal*. 2008 Dec;8(6):400-7. PubMed PMID: 18347611.
553. Kumar A, Vivekanandhan S, Srivastava A, Tripathi M, Padma Srivastava MV, Saini N, et al. Association between angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and ischemic stroke in north Indian population: a case-control study and meta-analysis. *Neurological research*. 2014 Feb 12;1743132814Y0000000335. PubMed PMID: 24620983.
554. Marciante KD, Bis JC, Rieder MJ, Reiner AP, Lumley T, Monks SA, et al. Renin-angiotensin system haplotypes and the risk of myocardial infarction and stroke in pharmacologically treated hypertensive patients. *American journal of epidemiology*. 2007 Jul 1;166(1):19-27. PubMed PMID: 17522061.
555. Ji P, Jiang L, Zhang S, Cui W, Zhang D, Fu S, et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) -344C/T polymorphism contributes to the risk of recurrent cerebral ischemia. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013 Jul;17(7):548-52. PubMed PMID: 23701507.
556. Park HK, Kim MC, Kim SM, Jo DJ. Assessment of two missense polymorphisms (rs4762 and rs699) of the angiotensinogen gene and stroke. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013 Jan;5(1):343-9. PubMed PMID: 23251296. Pubmed Central PMCID: 3524280.
557. Schelleman H, Klungel OH, Witteman JC, Breteler MM, Yazdanpanah M, Danser AH, et al. Angiotensinogen M235T polymorphism and the risk of myocardial infarction and stroke among hypertensive patients on ACE-inhibitors or beta-blockers. *European journal of human genetics : EJHG*. 2007 Apr;15(4):478-84. PubMed PMID: 17299437.
558. Li Y, Chen F, Zhou L, Coulter D, Chen C, Sun Z, et al. COC use, ACE/AGT gene polymorphisms, and risk of stroke. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010 May;20(5):298-306. PubMed PMID: 20300047.
559. Szolnoki Z, Maasz A, Magyari L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, et al. Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular medicine*. 2006;8(3):353-60. PubMed PMID: 16775386.

560. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992 Oct 2;71(1):169-80. PubMed PMID: 1394429.
561. de Leeuw FE, de Groot JC, Oudkerk M, Witteman JC, Hofman A, van Gijn J, et al. Hypertension and cerebral white matter lesions in a prospective cohort study. *Brain : a journal of neurology*. 2002 Apr;125(Pt 4):765-72. PubMed PMID: 11912110.
562. Sierra C, Coca A, Gomez-Angelats E, Poch E, Sobrino J, de la Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and cerebral white matter lesions in essential hypertension. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):343-7. PubMed PMID: 11882570.
563. Hassan A, Lansbury A, Catto AJ, Guthrie A, Spencer J, Craven C, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with leukoaraiosis in lacunar syndromes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2002 Mar;72(3):343-6. PubMed PMID: 11861692. Pubmed Central PMCID: 1737772.
564. Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, et al. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *American journal of hypertension*. 2000 Feb;13(2):121-7. PubMed PMID: 10701810.
565. van Rijn MJ, Bos MJ, Isaacs A, Yazdanpanah M, Arias-Vasquez A, Stricker BH, et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system are associated with blood pressure, atherosclerosis and cerebral white matter pathology. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007 Oct;78(10):1083-7. PubMed PMID: 17220293. Pubmed Central PMCID: 2117548.