



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad De Medicina

**ANÁLISIS DE MARCADORES INFLAMATORIOS Y POLIMORFISMOS EN
GENES DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS EN LA ISQUEMIA
CEREBRAL. RELACIÓN CON LA GRAVEDAD Y SITUACIÓN FUNCIONAL
TRAS EL ICTUS**

M^a ARACELI GARCÍA TORRES

2012



Fundación **Jiménez** Díaz - Capiro



PILAR LLAMAS SILLERO, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA: Que **Dña. M^a Araceli García Torres**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “**Análisis de marcadores inflamatorios y polimorfismos en genes de moléculas proinflamatorias en la isquemia cerebral. Relación con la gravedad y situación funcional tras el ictus**” y reúne, a mi juicio, los requisitos metodológicos, científicos, formales y de originalidad suficientes para ser presentado y defendido en el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al **Grado de Doctor**.

Y para que conste donde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Madrid a nueve de octubre de dos mil doce.

Fdo: Dra. M^a Pilar Llamas Sillero

A Mencía y Emma

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de numerosas personas.

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento a la Dra. Pilar Llamas, por confiar en mí para realizar este trabajo, por animarme en los momentos de desánimo y por ayudarme con sus consejos y enseñanzas.

A Ignacio Mahílo, por su ayuda continua con la estadística. Sin él este trabajo no hubiera sido posible.

A mi jefe, el Dr. Serratosa, y a todos mis compañeros del Servicio de Neurología de la Fundación Jiménez Díaz. A todas las enfermeras, residentes y médicos, que me han apoyado en muchos momentos de mi vida profesional. Quiero agradecer especialmente al Dr. Jorge Rábano, que ha sido mi maestro en esto de la Neurología y quien me animó a realizar esta tesis doctoral cuando aún no era ni un proyecto. A la Dra. Ivana Zamarbide, por ayudarme tanto en la ciencia y en lo personal, y por todos los buenos momentos. A las Dras. Aranda, Bellido y Losada y al Dr. Herranz, por haber sido los mejores residentes y compañeros que uno puede tener, dentro y fuera del hospital.

A los miembros del laboratorio de Hematología, en especial a Vanessa y Arancha, por aportar su trabajo a este proyecto.

A mi familia y a mis amigos, los de niña y los de ahora. Gracias, Salo, por estar siempre ahí.

A mi hermana, por ser mucho más que una hermana. Por ser mi mejor compañera, por apoyarme en todos los momentos y por enseñarme a ver la vida desde otra perspectiva.

A mi madre. Por enseñarme todo en la vida. Por demostrarme, con el ejemplo, que se puede ser la mejor madre del mundo y seguir siendo una excelente profesional. Ojalá algún día pueda seguir tus pasos.

A mis hijas, Mencía y Emma. Gracias a ellas por todo, por permitirme ver cuáles son las cosas realmente importantes, por darme la alegría de verlas cada día y por iluminar mi vida.

Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	15
1. Enfermedad cerebrovascular. Generalidades	17
1.1. Definición	17
1.2. Epidemiología	18
1.3. Factores de riesgo vascular	18
1.3.1. Factores de riesgo no modificables	19
1.3.2. Factores de riesgo modificables y bien documentados	20
1.3.3. Factores con menor evidencia científica o parcialmente modificables	23
2. Fisiopatología de la isquemia cerebral	24
2.1. La cascada isquémica	24
2.2. Arteriosclerosis e inflamación	25
2.2.1. Respuesta celular	26
2.2.2. Moléculas de adhesión	28
2.2.3. Citoquinas	29
2.2.4. Quimoquinas	32
3. Biomarcadores en el ictus isquémico	33
3.1. Biomarcadores de riesgo de ictus	34
3.2. Biomarcadores diagnósticos de infarto cerebral	35

3.3. Biomarcadores de tamaño del infarto cerebral _____	37
3.4. Biomarcadores pronósticos _____	37
3.4.1. De deterioro neurológico precoz _____	37
3.4.2. De infarto maligno _____	38
3.4.3. De transformación hemorrágica _____	38
3.4.4. De pronóstico funcional _____	39
4. Polimorfismos genéticos de moléculas proinflamatorias en la isquemia cerebral _____	40
4.1. Generalidades _____	40
4.2. Polimorfismos del gen de la IL-6 _____	41
4.3. Polimorfismos del gen de la IL-1 _____	43
4.4. Polimorfismos del gen del TNF- α _____	44
4.5. Otros polimorfismos _____	45
5. Estatinas en el ictus isquémico _____	45
5.1. Efectos clásicos _____	45
5.2. Efectos pleiotrópicos _____	46
5.2.1. Acción sobre la función endotelial _____	47
5.2.2. Acción sobre la proliferación de músculo liso _____	47
5.2.3. Acción sobre la función de las plaquetas _____	48
5.2.4. Acción sobre la estabilidad de la placa _____	48
5.2.5. Acción sobre los procesos inflamatorios _____	48
5.2.6. Protección contra radicales libres _____	49
5.2.7. Acción sobre la plasticidad neuronal _____	49

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____	51
PACIENTES Y MÉTODOS _____	55
1. Diseño del estudio _____	57
2. Población de estudio _____	57
2.1. Casos con infarto cerebral. Criterios de selección _____	57
2.1.1. Diagnóstico de infarto cerebral _____	57
2.1.2. Clasificación etiológica del infarto cerebral _____	58
2.2. Grupo control. Criterios de selección _____	59
3. Muestras extraídas _____	59
4. Variables clínicas analizadas en la población de estudio _____	60
4.1. Grupo de casos con infarto cerebral _____	60
4.1.1. Factores de riesgo vascular _____	60
4.1.2. Gravedad del infarto _____	61
4.1.3. Situación funcional _____	61
4.1.4. Otras variables _____	61
4.2. Grupo de controles _____	62
5. Variables analíticas _____	62
5.1. Descripción general de las variables analizadas _____	62
5.2. Estudio de citoquinas _____	62
6. Estudio de polimorfismos en genes de moléculas proinflamatorias _____	64

6.1. Análisis de SNPs por reacción en cadena de la polimerasa.	
Generalidades _____	64
6.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa _____	65
6.1.2. Reactivos y controles de la reacción en cadena de la polimerasa _____	65
6.2. Reacción en cadena de la polimerasa para cada polimorfismo ____	66
6.2.1. Polimorfismo -174 GC para IL-6 _____	66
6.2.2. Polimorfismo -889 CT para IL-1 α _____	67
6.2.3. Polimorfismo -511 CT para IL-1 β _____	68
6.2.4. Polimorfismo +3954 CT para IL-1 β _____	69
6.2.5. Polimorfismo -238 GA para TNF- α _____	70
6.3. Análisis de restricción y visualización para cada polimorfismo ____	71
6.3.1. Polimorfismo -174 GC para IL-6 _____	72
6.3.2. Polimorfismo -889 CT para IL-1 α _____	72
6.3.3. Polimorfismo -511 CT para IL-1 β _____	73
6.3.4. Polimorfismo +3954 CT para IL-1 β _____	73
6.3.5. Polimorfismo -238 GA para TNF- α _____	73
7. Análisis estadístico _____	74
RESULTADOS _____	77
1. Características demográficas. Distribución de los factores de riesgo vascular y otras variables clínicas _____	79
2. Características del infarto cerebral _____	81

3. Variables analíticas _____	82
3.1. Parámetros hematológicos y bioquímicos _____	82
3.1.1. Leucocitos: relación con otras variables _____	82
3.1.2. Fibrinógeno: relación con otras variables _____	83
3.2. Estudio de citoquinas _____	86
3.2.1. IL-6: relación con otras variables _____	87
3.2.2. IL-1 α e IL-1 β : relación con otras variables _____	89
3.2.3. TNF- α : relación con otras variables _____	90
4. Análisis de la relación de la toma previa de estatinas con otros parámetros _____	91
5. Estudio de polimorfismos en genes de moléculas proinflamatorias ____	93
5.1. Distribución de polimorfismos _____	93
5.1.1. Polimorfismo -174 GC en el gen de IL-6 _____	93
5.1.2. Polimorfismo -889 CT en el gen de IL-1 α _____	95
5.1.3. Polimorfismos -511 CT y +3954 CT en el gen de IL-1 β ____	95
5.1.4. Polimorfismo -238 GA en el gen de TNF- α _____	97
DISCUSIÓN _____	99
1. Características de la población estudiada _____	103
2. Relación entre concentración de fibrinógeno y situación funcional de los pacientes _____	105
3. Relación entre niveles de citoquinas con la gravedad del ictus y la situación funcional de los pacientes _____	106

4. Distribución de polimorfismos en genes de moléculas proinflamatorias _____	108
5. Relación de concentraciones de IL-6 con el uso previo de estatinas ____	111
CONCLUSIONES _____	113
ANEXOS _____	117
1. Escala NIHSS _____	119
2. Escala de Rankin modificada _____	122
BIBLIOGRAFÍA _____	123

ABREVIATURAS

A

Ac: Anticuerpo

ACM: Arteria cerebral media

ACO: Anticonceptivos orales

ADN: Ácido ribonucleico

Ag: Antígeno

AIT: Accidente isquémico transitorio

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

ATP: Adenosín trifosfato

B

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

BHE: Barrera hematoencefálica

C

CADASIL: Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía

COX: Ciclooxygenasa

D

DL: Dislipemia

DM: Diabetes mellitus

DNP: Deterioro neurológico precoz

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

E

EC: Escala Canadiense

EKG: Electrocardiograma

F

FA: Fibrilación auricular

FPP: Farnesil pirofosfato

FSC: Flujo sanguíneo cerebral

FT: Factor tisular

FVW: Factor Von Willeberand

G

GIM: Grosor íntima-media

H

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HTA: Hipertensión arterial

I

IAM: Infarto agudo de miocardio

IB: Índice de Barthel

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

sICAM: Molécula soluble de adhesión intercelular

ICC: Insuficiencia Cardíaca Congestiva

IL: Interleuquina

IL-1ra: Antagonista del receptor de interleuquina

IMC: Índice de masa corporal

INF: Interferón

L

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LDL: Lipoproteína de baja densidad

M

MCP: Proteína quimotáctica para monocitos

MMP: Metaloproteínasa de matriz

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

mRS: Escala de Rankin modificada

N

NF: Factor nuclear

NIHSS: Escala de ictus del Instituto Nacional de Salud

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

NOS: Sintasa de óxido nítrico

NOSi: Forma inducible de la sintasa de óxido nítrico

NOSe: Forma endotelial de la sintasa de óxido nítrico

O

OR: *Odds Ratio*

P

PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

R

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisms

RM: Resonancia magnética

rn: Rango normal

rpm: Revoluciones por minuto

rTPA: Activador tisular del plasminógeno recombinante

S

SNP: Polimorfismos de nucleótidos simples

T

TA: Tensión arterial

TAC: Tomografía axial computerizada

TGF: Factor de crecimiento transformante

TH: Transformación hemorrágica

TNF: Factor de necrosis tisular

tPA: Activador tisular del plasminógeno

V

VCAM: Molécula de adhesión vascular

sVCAM: Molécula soluble de adhesión vascular

VGEF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

VSG: Velocidad de sedimentación globular

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR. GENERALIDADES

1.1. Definición

La enfermedad cerebrovascular o ictus es un problema circulatorio cerebral en el cual un área del encéfalo se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico. Este término incluye de forma genérica un grupo de trastornos que comprenden el infarto cerebral, la hemorragia cerebral y la hemorragia subaracnoidea.

Existen diversas clasificaciones de la enfermedad cerebrovascular, en función del subtipo de ictus, el perfil evolutivo, los resultados de la neuroimagen, la etiología, el tamaño, la topografía de la lesión o el mecanismo de producción.

Según su naturaleza, la enfermedad cerebrovascular se puede presentar como isquemia o como hemorragia, con una proporción en torno al 85% y 15%, respectivamente.

La isquemia se produce por la disminución del aporte sanguíneo cerebral de forma total (isquemia global) o parcial (isquemia focal). La hemorragia es la presencia de sangre en el parénquima cerebral o en el interior de los ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral), o en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea).

Dentro de la isquemia cerebral, y teniendo en cuenta la duración de los síntomas, se debe distinguir entre accidente isquémico transitorio (AIT) e infarto cerebral.

Los AIT son episodios breves de pérdida de funciones cerebrales debidos a una isquemia cerebral. Convencionalmente se consideran AIT aquellos síntomas de menos de 24 horas de duración, aunque generalmente duran entre 2 y 15 minutos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que puede hallarse imagen de infarto cerebral en estos pacientes, fundamentalmente en los de larga duración.

El infarto cerebral se define como un déficit neurológico focal de más de 24 horas de duración secundario a una disminución del aporte circulatorio a un territorio cerebral, que ocasiona necrosis tisular.

1.2.Epidemiología

La enfermedad cerebrovascular es un importante problema de salud, ya que tiene una elevada prevalencia y es una importante causa de morbilidad y mortalidad [1]. Cada año unas 795.000 personas sufren un ictus, de los cuales 610.000 son primeros episodios y 185.000 ictus recurrentes. De todos ellos aproximadamente el 85% son isquémicos, 10% hemorrágicos y 3% hemorragias subaracnoideas [2].

En Europa tiene una prevalencia del 4,8% en personas de entre 65 y 84 años. Su incidencia aumenta de forma marcada con la edad, de forma que en la población de entre 65 a 84 años la incidencia de ictus es de 8,72 por 1.000 personas-año, y de 17,3 por 1.000 personas-año en mayores de 74 años [3].

En España constituye la primera causa de mortalidad en mujeres y la tercera en hombres, por detrás de la isquemia de miocardio y del cáncer de pulmón [4].

Además de la mortalidad (alrededor de un 10% de los pacientes de entre 45 y 64 años que sufren un ictus isquémico fallece en los primeros 30 días) [5], es importante destacar las consecuencias funcionales que tienen quienes sobreviven, ya que aproximadamente un 30% requiere algún tipo de ayuda para las actividades de la vida diaria y cerca de un 20% necesita ser institucionalizado [6]. Todo esto supone una notable demanda de cuidados, con una gran repercusión sobre la calidad de vida del paciente y de sus familiares.

Por todas estas razones, es fundamental conseguir una disminución de la incidencia de la enfermedad cerebrovascular, lo que se consigue, en gran parte, controlando los factores de riesgo susceptibles de modificación.

1.3.Factores de riesgo vascular

Un factor de riesgo se define como una característica biológica o hábito que se asocia con un mayor riesgo de presentar una determinada enfermedad. Su importancia radica en que identificarlos permite reducir las posibilidades de padecer dicha enfermedad.

Existen factores de riesgo modificables y otros que no se pueden modificar, pero que también es importante detectar, ya que ambos permiten clasificar los sujetos de alto riesgo de padecer una enfermedad vascular, en los que es más importante, si cabe, el control de los factores de riesgo modificables [7,8].

1.3.1. Factores de riesgo no modificables

- **Edad.** La incidencia de enfermedad cerebrovascular aumenta con la edad. El riesgo de ictus isquémico y hemorragia intracraneal se dobla en cada década a partir de los 50 años.

- **Sexo.** La prevalencia de ictus es mayor en hombres que en mujeres [9], excepto en la franja de edad entre 35 y 44 años y a partir de los 85 años. El uso de anticonceptivos orales y el embarazo en mujeres jóvenes, y la muerte relacionada con enfermedades cardíacas en varones mayores, podrían contribuir a estas diferencias [10,11].

- **Bajo peso al nacer.** Las personas con bajo peso al nacer tienen más riesgo de padecer un ictus [12] y mayor tasa de mortalidad por el ictus [13].

- **Raza/etnia.** Las personas de raza negra y algunos americanos hispánicos tienen una mayor incidencia de ictus, con una mayor tasa de mortalidad [10]. Esto puede ser debido a una mayor prevalencia de hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM) u obesidad, aunque no lo justifica por completo, por lo que probablemente existan otros factores asociados, relacionados con cuestiones genéticas.

- **Factores genéticos.** Se requieren estudios más amplios, pero la evidencia existente hasta el momento pone de manifiesto un incremento del riesgo de ictus de hasta un 30% en personas con historia familiar de isquemia cerebral [14,15]. Esto puede ser debido a una herencia de los factores de riesgo, a una susceptibilidad genética a dichos factores de riesgo, a que las personas de la misma familia suelen tener hábitos de vida y ambientes similares o a una interacción entre los anteriores.

Existen patologías relacionadas con el ictus con un componente monogénico bien definido (CADASIL, síndrome de Marfan, neurofibromatosis, etc), pero en la mayor parte de las ocasiones la relación del ictus con la genética resulta de un efecto multiplicativo de un amplio espectro de alelos patogénicos, cada uno de los cuales confiere un ligero aumento del riesgo [16]. Algunos de estos alelos predisponen a un tipo etiológico concreto (por ejemplo, el polimorfismo -572GC del gen de la IL-6 se relaciona con el ictus aterotrombótico y la hemorragia intracraneal, siendo el alelo C factor de riesgo [17]), mientras que otros pueden afectar a la gravedad del ictus (el polimorfismo 312AT del gen del fibrinógeno α se asocia con un incremento en la mortalidad asociada al ictus en pacientes con fibrilación auricular, siendo el alelo A el

marcador de riesgo [18]), o al riesgo de recidiva (la presencia del alelo T en el polimorfismo 1444CT del gen de la proteína C reactiva se asocia con un mayor riesgo de recurrencia de eventos isquémicos en pacientes con estenosis intracraneal sintomática) [19].

1.3.2. Factores de riesgo modificables y bien documentados

- **HTA.** Es un factor de riesgo importante para la enfermedad cerebrovascular, tanto isquémica como hemorrágica. La relación de la presión arterial y el ictus es fuerte, continua, gradual, consistente, independiente, predictiva y con significado etiológico [20]. Hay estudios que indican que un descenso de la presión arterial de 5-6 mmHg reduce en un 42% el riesgo de ictus [21].

Se recomienda un objetivo terapéutico de cifras menores de 140/90mmHg en la población general y de 130/80 mmHg en las personas diabéticas [20].

- **Tabaquismo.** Existe evidencia del aumento de riesgo de ictus en personas fumadoras [22], que es mayor cuanto mayor sea el consumo de tabaco. Además puede potenciar otros factores de riesgo, como la presión arterial sistólica o los efectos secundarios protrombóticos de los anticonceptivos orales.

El abandono del consumo de tabaco reduce rápidamente el riesgo de ictus y otros problemas cardiovasculares, aunque sin alcanzar el nivel de las personas que nunca han fumado [23].

- **DM.** Las personas con diabetes tienen mayor susceptibilidad a la aterosclerosis y una mayor prevalencia de factores de riesgo proaterogénicos, fundamentalmente HTA y dislipemia (DL). Por estas razones la diabetes es un factor de riesgo de ictus, aumentando su riesgo relativo entre 1,8 y 6 veces [24].

- **DL.** Diversos estudios relacionan cifras elevadas de colesterol total con el infarto cerebral, y cifras bajas con la hemorragia cerebral. Cuando los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) aumentan, las LDL se retienen en la matriz extracelular de la arteria y son diana de ataques oxidativos y enzimáticos. Los fosfolípidos que se liberan de las LDL pueden activar células endoteliales para que expresen moléculas de adhesión leucocitaria, lo que desencadena una respuesta inflamatoria que ocasiona el crecimiento

de la placa y finalmente su ruptura, formación de trombo y consecuentemente isquemia arterial e infarto [25].

Aunque hay algunos datos contradictorios, en general, los estudios relacionan la hipertrigliceridemia con el riesgo de ictus isquémico [26]. También existe evidencia de la relación inversa entre cifras plasmáticas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) e ictus [27].

- **Fibrilación auricular.** La fibrilación auricular (FA), aún en ausencia de patología valvular, aumenta 4-5 veces el riesgo de ictus isquémico por émbolos cardíacos [28].

El antecedente de ictus o AIT previo es el mayor factor de riesgo para padecer una isquemia cerebral secundaria a la FA. Existen diversas clasificaciones para graduar el riesgo de ictus en una persona con FA [29,30] lo que conlleva tratamientos diferentes. En general las guías recomiendan tratamiento anticoagulante en personas con FA no valvular que además presenten algún otro factor de riesgo para padecer un ictus (edad, AIT o ictus previo, HTA, insuficiencia cardíaca o DM) y tratamiento antiagregante en el resto.

- **Otras patología cardíacas:** otras arritmias, trombos de ventrículo izquierdo, tumores cardíacos, vegetaciones, válvulas protésicas, miocardiopatía dilatada, valvulopatías o endocarditis, coronariopatía e infarto agudo de miocardio (IAM).

Tras un IAM el riesgo de ictus es de 1-2% al año, siendo mayor en el primer mes, en que puede alcanzar hasta el 31%.

Además, también pueden ser causa de ictus algunos procedimientos externos como los cateterismos cardíacos, implantes de marcapasos o la cirugía de revascularización coronaria.

- **Estenosis carotídea asintomática.** La enfermedad carotídea aterosclerótica es un factor de riesgo importante para el ictus, que además aumenta con el aumento del grado de estenosis [31].

En pacientes con estenosis carotídea asintomática se considera el tratamiento médico de control de factores de riesgo (antiagregantes, estatinas, hipotensores, etc) y el tratamiento de intervención carotídea (cirugía o tratamiento endovascular con colocación de “stent”). Aunque la elección de una u otra modalidad terapéutica es

controvertida, estudios aleatorizados demuestran que en algunos casos la cirugía reduce el riesgo de ictus frente al tratamiento médico [32].

- **Enfermedad de células falciformes.** Es una enfermedad autosómica recesiva, que se caracteriza por la producción de una cadena B de la hemoglobina que es anormal. Esto ocasiona clínica secundaria a procesos vasooclusivos, con infartos en localizaciones variables, incluyendo isquemia cerebral.

En estos pacientes se debe realizar despistaje con doppler transcraneal a partir de los 2 años, y se recomienda tratamiento con transfusiones sanguíneas cuando se constatan velocidades medias en el doppler transcraneal a partir de 250cm/s [33].

- **Tratamiento hormonal sustitutivo.** Aunque en algún momento se sugirió que este tratamiento podía disminuir el riesgo vascular, estudios posteriores demostraron que dicho tratamiento no sólo no era eficaz a este respecto, sino que incluso podía aumentar el riesgo cardiovascular en algunos casos, por lo que en la actualidad no se recomienda como tratamiento preventivo de la enfermedad cardiovascular [34].

Sin embargo, hay alguna teoría que postula que los estrógenos administrados a mujeres jóvenes promueven efectos beneficiosos en la vasculatura, pero que cuando la aterosclerosis está avanzada pueden acelerar su desarrollo [35].

- **Anticonceptivos orales (ACO).** El uso de ACO con alto contenido en estradiol ($\geq 50\mu\text{g}$) se relaciona con un incremento del riesgo de ictus, que no es tan evidente con dosis menores.

Existen grupos de mujeres con un mayor riesgo asociado, que son aquellas de más edad, tabaquismo, HTA, DL, migraña, obesidad y las portadoras de algunas mutaciones protrombóticas como el factor V Leiden o la mutación 20210A del gen de la protrombina [36].

- **Factores nutricionales.** Existen diversos factores dietéticos y nutricionales que pueden aumentar el riesgo de ictus. Por ejemplo, la ingesta de una dieta rica en sodio puede favorecer la aparición de HTA, postulado como el principal factor de riesgo de ictus. Asimismo, las dietas bajas en potasio o el exceso de peso también pueden favorecer la HTA [37,38]. Las dietas ricas en vegetales y fruta pueden contribuir a disminuir el riesgo de ictus, mediante mecanismos antioxidantes o mediante la elevación de los niveles de potasio.

- **Inactividad física.** Un estilo de vida sedentario aumenta el riesgo de ictus, así como de mortalidad global y morbimortalidad cardiovascular.

El efecto protector de la actividad física está mediado por su papel en la reducción de factores de riesgo vascular, tales como la HTA, y por otros mecanismos como la reducción de los niveles plasmáticos de fibrinógeno, de la actividad plaquetaria y mediante la elevación de la actividad del activador tisular del plasminógeno (tPA) y de las concentraciones de colesterol HDL [39-42].

- **Obesidad y distribución de la grasa corporal.** Las personas con sobrepeso (índice de masa corporal -IMC- entre 25 y 29kg/m²) y obesidad (IMC \geq 30kg/m²) tienen un mayor riesgo de ictus y una mayor mortalidad asociada con los accidentes cerebrovasculares [43].

1.3.3. Factores de riesgo con menor evidencia científica o parcialmente modificables

Existen otras situaciones clínicas que parecen estar relacionadas con la incidencia del infarto cerebral, como son la migraña (fundamentalmente con aura), el síndrome metabólico, el consumo de alcohol a dosis altas (por el contrario se ha observado que pequeñas cantidades de alcohol, sobre todo vino, protegen de la isquemia cerebral), el consumo de drogas, trastornos respiratorios del sueño, hiperhomocisteinemia, elevación de la lipoproteína a y los estados de hipercoagulabilidad.

La inflamación y la infección son otros dos factores de riesgo que parecen estar relacionados con la isquemia cerebral. Existen diversos aspectos que relacionan el infarto cerebral con la inflamación, ya que por una parte, hay una relación entre ésta y los factores de riesgo clásico que hemos mencionado y por otra, se considera la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria [44].

Los factores de riesgo vascular clásicos (HTA, DL, tabaquismo) aumentan los niveles de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lo que hace aumentar la migración transendotelial de los linfocitos *in vitro* [45]. Además, los monocitos circulantes regulan los niveles plasmáticos de TNF- α y pueden causar un efecto similar *in vivo*. El colesterol es un factor que activa los monocitos y se acumula en ellos a medida que maduran como macrófagos o como células grasas. Además la hipercolesterolemia

aumenta marcadores de activación en las células inflamatorias y en el endotelio [44,46].

La HTA mantenida se asocia con un aumento de los niveles circulantes de la molécula soluble de adhesión intercelular-1 (sICAM-1), de la molécula soluble de adhesión vascular-1 (sVCAM-1) y de la E- selectina [47]. También se ha comprobado que los monocitos de pacientes hipertensos están “preactivados” comparados con los de personas sanas, lo que ocasiona que liberen más cantidad de TNF- α tras ser estimulados con lipopolisacáridos [48].

El tabaquismo es un factor que favorece la coagulabilidad y puede ser proinflamatorio. Se ha demostrado un aumento en la expresión de factor tisular (FT) en mujeres fumadoras, probablemente secundario a la inducción del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) en monocitos [49]. Además aumenta los niveles circulantes de sICAM-1 y disminuye el número de monocitos circulantes, lo que puede ser secundario a un aumento de la adhesión intercelular [50].

2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

2.1.La cascada isquémica

El cerebro humano comprende el 2% del peso corporal total, pero su requerimiento de oxígeno es el 20% del total corporal. El flujo sanguíneo cerebral (FSC) es de $>50\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$, y cuando desciende por debajo de $10\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$ se produce la muerte celular por alteración de los mecanismos que mantienen el equilibrio iónico. No obstante, entre las zonas normalmente perfundidas y las zonas isquémicas hay una región de hipoperfusión, cuyo mejor o peor funcionamiento depende de la circulación colateral. Estudios recientes con tomografía por emisión de positrones permiten distinguir 2 zonas en esta región hipoperfundida: un área de oligohemia (con FSC $>22\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$), en la que la isquemia sólo ocurre en circunstancias muy adversas, y un área de FSC muy reducido (por debajo de $22\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$), conocida como el área de penumbra isquémica. En la fase de isquemia aguda la mayor parte de esta zona de penumbra progresa a isquemia si no hay un restablecimiento inmediato de la perfusión cerebral adecuada [51,52].

La isquemia cerebral es una cascada de eventos desencadenados como consecuencia de la disminución del FSC que ocasiona alteraciones metabólicas, con cambios en los niveles de oxígeno y del metabolismo de la glucosa, y depleción de metabolitos energéticos, que incluyen adenosín trifosfato (ATP), fosfocreatina, lactato y N-acetilaspártato.

La reducción del ATP ocasiona una depolarización de la membrana celular y alteración de la permeabilidad de la membrana (por bloqueo de las bombas Na^+/K^+ ATPasa y Ca^{2+} ATPasa), con un aumento de las concentraciones intracelulares de Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- y un aumento del K^+ extracelular, lo que a su vez ocasiona un aumento de la liberación extracelular de glutamato y de otros aminoácidos excitadores e inhibidores, como glicina y ácido gamma-aminobutírico (GABA), respectivamente. El glutamato activa los canales mediados por glutamato (N-metil-D-aspartato-NMDA- y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato -AMPA-), lo que conlleva un aumento del calcio intracelular. Este aumento del calcio intracelular desencadena una cascada inflamatoria, que comienza con la expresión local de citoquinas, entre otras TNF- α e interleuquina 1 β (IL-1 β), que a su vez estimula la liberación de otras citoquinas, como IL-6 e IL-8, y factores quimotácticos, tales como moléculas de adhesión leucocitaria (selectinas), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM 1) y molécula de adhesión plaquetaria y endotelial. Los leucocitos que llegan a la zona de isquemia interaccionan con las células endoteliales de los capilares, ocasionando la oclusión de las arterias y secundariamente un fenómeno de “no reflujo”. Además, estos leucocitos estimulan la liberación de sustancias vasoconstrictoras y enzimas proteolíticas que rompen la barrera endotelial y permiten el flujo de agua y eritrocitos, lo que a su vez produce edema celular y transformación hemorrágica de la lesión isquémica [53].

2.2. Arteriosclerosis e inflamación

La arteriosclerosis es un término genérico para describir el endurecimiento y engrosamiento de las arterias, en las que la lesión fundamental es la placa de ateroma. Es un proceso multifactorial, sobre cuyo origen existen muy diversas teorías, siendo una de las más aceptadas la teoría de Ross, en la que el estadio inicial de la arteriosclerosis sería el daño endotelial, que ocasiona una serie de respuestas moleculares y celulares que conllevan la formación de la placa de ateroma [54,55].

Cuando los niveles plasmáticos de VLDL y LDL crecen, las partículas de LDL se acumulan en la matriz extracelular de la arteria, donde pueden ser oxidadas. Los fosfolípidos liberados de las LDL activan el endotelio que de esta forma expresa moléculas de adhesión leucocitaria y quimoquinas, que ocasionan un reclutamiento de monocitos y células T [25]. Así se aumenta la permeabilidad del endotelio y la adhesividad de leucocitos y plaquetas circulantes, lo que conlleva una descarga y activación de factores activadores almacenados en las plaquetas (ligandos de membrana y quimoquinas), que a su vez juegan un papel en el reclutamiento de más plaquetas, leucocitos u otras células sanguíneas a la pared vascular. Como resultado, se altera el equilibrio de la síntesis de moléculas vasoactivas, con predominio de las vasoconstrictoras, de las citoquinas y de los factores de crecimiento.

A partir de la acumulación inicial de células mononucleares se forman células espumosas por captación de lípidos. Además, los factores liberados por los macrófagos y leucocitos liberan otros factores proinflamatorios que estimulan la proliferación y migración de células musculares lisas.

Si la respuesta inflamatoria se mantiene se liberarán enzimas hidrolíticas, quimoquinas y factores de crecimiento que aumentan el daño endotelial. La matriz del tejido conectivo queda expuesta a la luz y se constituirá el lugar potencial de depósito de agregados de plaquetas y trombos murales.

Durante este proceso tiene lugar una respuesta fibroproliferativa que es la culminación de la respuesta inflamatoria mantenida y que constituye el estado avanzado de la placa fibrosa. En este punto la arteria no puede compensar más los cambios estructurales y la lesión tiende a protruir hacia la luz, con las consiguientes alteraciones del flujo [56,57].

Por estas y otras razones se considera que la inflamación juega un papel importante en la isquemia cerebral, aunque todavía existen estudios contradictorios en cuanto a determinar si el efecto de la inflamación en dicha isquemia es siempre deletéreo o puede tener cierto componente beneficioso para el organismo [58].

2.2.1. Respuesta celular

Se ha demostrado que el infiltrado inflamatorio está presente desde las primeras fases de la enfermedad [59], más prominente incluso que la proliferación de células de

músculo liso [55]. Las principales células que participan en las lesiones arterioscleróticas son leucocitos, plaquetas y células mastoideas, además de las células musculares lisas.

Tras la interrupción del FSC se produce una infiltración de **leucocitos** (polimorfonucleares y monocitos/macrófagos) que son los mediadores celulares de las subsiguientes obstrucción microvascular, necrosis celular e infarto tisular.

Aunque inicialmente se creía que la acumulación leucocitaria ocurría de forma tardía con el objetivo de destruir los residuos y formar cicatrices, se ha observado que aparece desde los primeros momentos de la isquemia cerebral, independientemente de la presencia de neuronas necróticas, con lo que juega un papel esencial en la iniciación y propagación del daño tisular secundario a la isquemia cerebral. Existe un perfil específico de mediadores inflamatorios en este contexto que incluye moléculas de adhesión (selectinas, integrinas e inmunoglobulinas), citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α y factor de crecimiento transformante β -TGF- β -) y quimoquinas (proteína quimotáctica para monocitos -MCP-1), de las que se hablará detalladamente más adelante [60].

Los neutrófilos se acumulan en el cerebro a los 30 minutos de la obstrucción permanente de la arteria cerebral media. El reclutamiento de estos neutrófilos al cerebro isquémico comienza con su paso por las paredes de los vasos sanguíneos del endotelio activado, mediado por selectinas, que es seguido por la activación y adherencia de dichos neutrófilos, mediados por integrinas e inmunoglobulinas. Una vez adheridos a las paredes vasculares, los neutrófilos migran al parénquima cerebral, lo que está facilitado por la disfunción de la barrera hematoencefálica (BHE) [51]. Tras entrar en el parénquima ocasionan daño tisular liberando radicales libres y enzimas proteolíticas.

Las **células de músculo liso** proliferan y se extienden hasta los márgenes de la lesión en la región subendotelial, donde formarán la cubierta de la placa aterosclerótica, gracias a su capacidad para elaborar el estroma de sostén, constituido por colágeno, proteoglicanos y elastina.

En las fases iniciales de la enfermedad arteriosclerótica predomina la actividad contráctil de estas células musculares, mientras que en las fases avanzadas predominan las células musculares lisas sintéticas, lo que empeora la reactividad vascular [56].

Las **plaquetas** son elementos muy importantes en el desarrollo y progresión de la isquemia cerebral, tanto por su papel directo sobre el endotelio como por su función

como puente de unión de los vasos con otras células. Las plaquetas se adhieren al endotelio disfuncional, al colágeno expuesto y a los macrófagos, lo que facilita su activación y liberación de aminas vasoactivas (serotonina e histamina) y factores de crecimiento: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico y TGF- β . Este factor, a su vez contribuye a la proliferación de células de músculo liso y macrófagos y al depósito de matriz rica en colágeno en el “core” y en el borde de la placa de ateroma. También facilitan la secreción de proteínas que degradan la matriz, con la consecuente ruptura de la placa [56].

Las plaquetas activadas expresan P-selectina en su superficie, que actúa como receptor para los leucocitos que de esta forma se acumulan en la lesión. Asimismo liberan mediadores protrombóticos y proinflamatorios, entre otros, el ligando soluble CD40, que se une al CD40 de las células endoteliales e induce la expresión de moléculas de adhesión relacionadas con el tráfico leucocitario (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina). Además secretan muchas otras sustancias proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6, que activan leucocitos y células endoteliales y a su vez aumentan la expresión de otros mediadores inflamatorios, como TNF- α , que induce activación celular y apoptosis [57].

2.2.2. *Moléculas de adhesión*

Existen tres clases de moléculas de adhesión que influyen en la migración leucocitaria y en las interacciones intercelulares durante la respuesta inflamatoria, a saber: selectinas, integrinas y proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Las **selectinas**, P, E y L, son glicoproteínas que median interacciones de baja afinidad entre leucocitos y células endoteliales. La P-selectina se encuentra en plaquetas y células endoteliales y las E y L-selectinas en células endoteliales y leucocitos.

Las **integrinas** son proteínas de membrana heterodiméricas que tienen un papel importante en las interacciones intercelulares y en la matriz extracelular. La unión de un ligando a dichas proteínas induce un cambio conformacional en el dominio intracelular, lo que ocasiona una modificación del citoesqueleto que permite la migración de la célula. En el cerebro unen las células endoteliales, los astrocitos y la lámina basal que

componen la BHE, por lo que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la microvasculatura cerebral [61].

La **superfamilia de las inmunoglobulinas** está constituida por diversas moléculas, muchas de las cuales se expresan en las células endoteliales activadas, entre otras ICAM-1, ICAM-2, molécula de adhesión plaqueto-endotelial y VCAM-1. En general median la adhesión entre leucocitos y endotelio, y crean una unión de mayor intensidad que las selectinas [62,60].

Se han propuesto vías de investigación dirigidas a bloquear la adhesión mediada por P-selectina o por ICAM-1, con la consiguiente reducción de la respuesta inflamatoria a la isquemia, la disminución del volumen de infarto, y la mejoría de la recuperación funcional [63].

2.2.3. Citoquinas

Las citoquinas son glicoproteínas pequeñas liberadas por diversas células en respuesta a estímulos.

Durante la isquemia cerebral se liberan diversas citoquinas, como IL-1, IL-6, TNF- α y TGF- β , que son producidas por diferentes células (células endoteliales, plaquetas, leucocitos y fibroblastos) y que tienen múltiples funciones: modulan la expresión de receptores en sus células diana, modulan la expresión de moléculas de adhesión y alteran los niveles de mediadores endógenos implicados en la trombogénesis [60].

La producción de **IL-1** aumenta durante la isquemia cerebral en microglía, astrocitos y neuronas [51, 60], siendo la IL-1 β el tipo principal de IL-1 liberado en la isquemia cerebral. No está claro cuál es el mecanismo de acción de la IL-1 en el cerebro isquémico. Se sabe que su liberación desencadena una serie de respuestas que pueden inhibir, exacerbar o inducir daño y muerte neuronal, tales como: fiebre, edema, lesión de la vasculatura cerebral, activación de la glía, inducción de neurotrofinas, de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), de la proteína precursora de amiloide, de moléculas de adhesión y del factor estimulante de corticotropinas, liberación de óxido nítrico y otros radicales libres, activación del complemento y modificación de la homeostasis del calcio [64]. Es importante su papel como inductora de la expresión de moléculas de

adhesión endotelial, tales como E-selectina, ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1, lo que parece relacionar los niveles elevados de esta molécula tras la isquemia cerebral, con el aumento de neutrófilos y la subsiguiente necrosis tisular [60]. La actividad de la IL-1 está regulada a través del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra) [65]. Diversos estudios han demostrado que la administración del IL-1ra en ratas sometidas a obstrucción de la arteria cerebral media (ACM) [66] disminuye la extensión de la necrosis tisular y la gravedad de los déficits neurológicos, y que la concentración de esta molécula se relaciona con el pronóstico a los 6 meses [67].

La **IL-6** es una glicoproteína de 20-30 kDa, producida en diferentes células entre las que están las células endoteliales, monocitos, macrófagos y las células T y B.

En situación basal se liberan pequeñas cantidades de IL-6 que aumentan de forma notable tras la estimulación. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de LDL oxidada en astrocitos de zonas cerebrales infartadas estimula la secreción de IL-6 por dichas células [68].

Esta citoquina ejerce multitud de funciones, tanto beneficiosas como perjudiciales para las células del sistema nervioso central (SNC). En función de la célula diana puede actuar como factor de crecimiento, inhibidor de crecimiento o como inductor de diferenciación celular [69].

Existen diversas evidencias de su papel proinflamatorio. La IL-6 es una de las citoquinas del SNC implicada en las respuestas celulares. Organiza la respuesta inflamatoria entre células sanguíneas, endotelio y células parenquimatosas cerebrales, siendo capaz de inducir la síntesis de quimoquinas y moléculas de adhesión que permiten la infiltración leucocitaria en el cerebro.

Algunos estudios demuestran que en pacientes con infarto cerebral, niveles plasmáticos más elevados de IL-6 se relacionan con un mayor volumen de infarto [70] o con un peor pronóstico [71].

Por otra parte se cree que puede desempeñar un papel neuroprotector de diversas maneras: mediante su capacidad para inducir la síntesis del IL-1ra [65], reduciendo el daño neuronal mediado por NMDA [72], disminuyendo la concentración de citoquinas proinflamatorias y aumentando las moléculas antiinflamatorias. Asimismo hay estudios que demuestran que la administración de anticuerpos anti IL-6 en ratas sometidas a

obstrucción de la ACM aumenta el número de células apoptóticas en la zona periinfarto, aumenta el tamaño del infarto y empeora el pronóstico funcional, asociado a una disminución de la fosforilación de la proteína Stat3, que parece ser otro de los mecanismos a través de los que la IL-6 ejerce su acción neuroprotectora [73].

El **TNF- α** , al igual que la IL-1, es otra citoquina implicada en el inicio de la respuesta inflamatoria. Su activación en la isquemia cerebral ocurre de forma precoz pero transitoria, e induce una segunda respuesta inflamatoria más persistente, mediada fundamentalmente por la IL-6 y la IL-8. En la isquemia cerebral es liberada por neuronas, astrocitos, microglía y granulocitos.

Diversos trabajos evidencian que pacientes con infarto cerebral con niveles mayores de TNF- α tiene un mayor volumen de infarto, un peor pronóstico funcional [74,75] y un mayor riesgo de recurrencia [76]. También se ha demostrado que la inyección intraventricular de TNF- α 24 horas antes de la oclusión de la ACM aumentaba de forma significativa el tamaño del infarto, efecto que se podía revertir con la aplicación de anticuerpos antiTNF- α [77].

El TNF- α es capaz de inducir la producción de metaloproteinasas, como la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP- 9), ya que el promotor del gen de la MMP-9 tiene una zona de unión para factores de transcripción, como la proteína activada-1 y el NF-kB, que responde a numerosos estímulos inflamatorios. Los genes de respuesta inmediata (c-fos y c-jun) forman un heterodímero que activa el gen de MMP-9, y así el TNF- α estimula la producción de esta metaloproteinasa lo que permite la migración leucocitaria a través del endotelio, destruye la BHE y contribuye a la formación de edema [52]. También induce la expresión de moléculas de adhesión en las células gliales y células endoteliales del cerebro, lo que favorece la acumulación y migración leucocitaria transendotelial [51,60], además de estimular la expresión de factor tisular (FT) y la liberación de óxido nítrico (NO), factor VII/factor von Willebrand (FVW), factor activador plaquetario, endotelina, supresión del sistema trombomodulina-poteína C-proteína S, disminución del activador tisular del plasminógeno (tPA) y liberación de inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) [64]. Esto favorece un cambio fenotípico en las células endoteliales cerebrales, lo que contribuye a formar un medio procoagulante en los microvasos cerebrales. El TNF- α también activa a las células

gliales para formar cicatrices, como parte del proceso de reparación en respuesta a la isquemia [60].

Hay evidencia de que la elevación crónica del TNF- α en el cerebro aumenta la susceptibilidad al daño isquémico pero no tiene efecto en la densidad vascular. Un estudio con ratas transgénicas para TNF- α , que sobreexpresaban en el cerebro el gen del TNF- α , demostró que los animales transgénicos eran más susceptibles a la muerte por apoptosis tras la oclusión de la ACM que los animales salvajes [78].

2.2.4. Quimoquinas

Las quimoquinas son un tipo especial de citoquinas con la capacidad de hacer migrar a diversas células hacia el lugar en el que están. Son una familia de moléculas de bajo peso molecular que comparten una estructura con 4 residuos de cisteína. Estos se unen a receptores específicos compuestos por 7 dominios transmembrana que están unidos a proteínas-G, activando proteínquinas intracelulares. Las citoquinas pueden estimular la producción y liberación de diversas quimoquinas, como la proteína MCP-1 [60].

La **MCP-1** es una molécula de 8-15kD constituida por 76 aminoácidos. Se expresa en órganos periféricos y en el sistema nervioso central se puede expresar en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con gliomas malignos, encefalitis alérgica experimental y en tejidos de tumores cerebrales [79]. Se ha demostrado un aumento transitorio del mRNA de MCP-1 en modelos experimentales de isquemia focal en ratas, y también se ha demostrado que las células endoteliales y los macrófagos del cerebro isquémico pueden expresar MCP-1 [80,81].

Diversas moléculas inflamatorias como IL-1, TNF- α , interferón- γ (INF- γ), lipopolisacáridos y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), pueden estimular la producción de MCP-1 en algunas células tales como leucocitos, células endoteliales, fibroblastos o células epiteliales [79,60], así como favorecer la proliferación, migración y diferenciación de progenitores neurales [82].

Se ha demostrado que la oclusión transitoria de la ACM en ratas ocasiona un aumento de los niveles de MCP-1 en el hemisferio sometido a isquemia [83] y un aumento de expresión de mRNA de MCP-1 en el estriado y cortex ipsilateral [84].

Con técnicas de inmunofijación se observa que la expresión de MCP-1 se localiza en la microglía y astrocitos de las áreas isquémicas. Asimismo la infusión de MCP-1 en el estriado normal induce la migración de neuroblastos al sitio de infusión [84].

Otros estudios ponen de manifiesto que la MCP-1 en la isquemia cerebral es necesaria para el reclutamiento de células desde la sangre, ya que se observa que en ratas deficientes para MCP-1 existe menos infiltración de macrófagos y neutrófilos procedentes de sangre periférica [85].

3. BIOMARCADORES EN EL ICTUS ISQUÉMICO

Como se ha detallado previamente, la isquemia cerebral conlleva la activación de una cascada de eventos moleculares que tienen como resultado la liberación en sangre periférica de determinadas sustancias que pueden utilizarse como biomarcadores. Estos son sustancias características que se pueden medir y evaluar de forma objetiva como indicadores de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica [86].

Para que sean útiles, los biomarcadores utilizados para estratificar el riesgo en la enfermedad vascular deben cumplir una serie de requisitos: tener una forma estandarizada de determinación con un adecuado control de variabilidad, ser estadísticamente independientes de otros factores de riesgo establecidos, tener una asociación con los objetivos propuestos demostrable en estudios clínicos y poder ser válidos para poblaciones diferentes. Además deberían tener una relación coste-beneficio aceptable [46,87].

Las características necesarias para cada biomarcador dependen de las funciones que vayan a desempeñar. Por ejemplo, un biomarcador que vaya a ser usado para diferenciar un evento cerebrovascular agudo de otros simuladores de ictus debe tener una alta sensibilidad, aunque sea menos específico, para garantizar una adecuada evaluación de todos los pacientes que realmente tengan un evento cerebrovascular. Sin embargo, una vez que se ha establecido el diagnóstico de isquemia cerebral y se necesita decidir qué paciente es candidato para un determinado tratamiento, como por

ejemplo la fibrinólisis, se necesitaría un biomarcador que permitiese identificar la hemorragia intracraneal con un 100% de sensibilidad. Por el contrario, si lo que se quiere es hacer un cribaje prehospitalario de hemorragia cerebral la sensibilidad del biomarcador debe ser alta, pero no necesariamente del 100% [88].

En relación a la isquemia cerebral existen biomarcadores especialmente útiles para diversos propósitos: marcadores de riesgo de ictus, marcadores diagnósticos de infarto cerebral, marcadores del tamaño del infarto y marcadores pronósticos. Dentro de estos últimos se pueden distinguir marcadores de deterioro neurológico precoz (DNP), de infarto maligno y de transformación hemorrágica (TH) [53,88].

3.1. Biomarcadores de riesgo de ictus

Diversos estudios epidemiológicos evidencian que el recuento leucocitario y la cantidad plasmática de fibrinógeno están asociados con mayor riesgo de eventos isquémicos. En concreto, se ha asociado el número de leucocitos con el riesgo de padecer un primer evento isquémico cerebral [89] o de recurrencia de ictus [90,62], independientemente de otros factores. También se ha demostrado que niveles elevados de fibrinógeno se asocian con un mayor riesgo de ictus [62,91].

Otro marcador inflamatorio clásico es la proteína C reactiva, que es una proteína de fase aguda de síntesis hepática, cuyos niveles están relacionados con un mayor riesgo de eventos coronarios en personas con enfermedad coronaria inestable y con isquemia cerebral y también en personas sanas [92-94]. Sin embargo, algunos estudios ponen de manifiesto que este aumento del riesgo está en relación con otros marcadores de inflamación [95].

Se sabe que la IL-6 juega un papel importante en la cascada inflamatoria asociada a la isquemia. Se han publicado resultados en los que niveles de IL-6 se asocian con otros marcadores inflamatorios mediados por esta citoquina, tales como proteína C reactiva, fibrinógeno o recuento leucocitario [96,97], y en los que los niveles plasmáticos de IL-6 se relacionan con un mayor riesgo de enfermedad coronaria e isquemia cerebral [96]. Un trabajo reciente, en el que de forma prospectiva se evaluaba el riesgo de recurrencia de ictus en pacientes no anticoagulados, demostró que niveles basales de IL-6 por encima de 5 pg/ml y de VCAM-1 por encima de 1.350 ng/ml aumentaban en 21 y 4 veces respectivamente el riesgo de nuevos eventos vasculares o

de muerte por enfermedad vascular [98]. Otros estudios ponen de manifiesto que la asociación de marcadores de respuesta de fase aguda (IL-6, TNF- α , proteína C reactiva y fibrinógeno) se asocian con riesgo de recurrencia de ictus, siendo dependientes unos de otros en modelos multivariados [76].

3.2. Biomarcadores diagnósticos de infarto cerebral

La historia clínica y la exploración física son puntos fundamentales en el diagnóstico y manejo de los pacientes con sospecha de enfermedad cerebrovascular aguda, siendo imprescindible además la realización de una técnica de neuroimagen para diferenciar la isquemia de la hemorragia cerebral. En la mayor parte de los hospitales la tomografía axial computerizada (TAC) craneal sigue siendo la técnica más disponible. Sin embargo, menos de la tercera parte de los pacientes con isquemia cerebral tienen alteraciones en el TAC craneal en las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas [99].

En algunos casos la gravedad de los signos precoces de isquemia se correlaciona con niveles elevados de diversas moléculas en plasma. De este modo se ha puesto de manifiesto que: niveles elevados de glutamato se correlacionan con una hipodensidad en el TAC sin efecto de masa (*Odds Ratio* -OR- 13,2), niveles elevados de TNF- α e IL-6 se correlacionan con borrado de los surcos corticales (OR 21,6 y 18,2, respectivamente), niveles altos de IL-6 y de MMP-9 con asimetría ventricular (OR 26,5 y 11,9) y niveles elevados de MMP-9 con un desplazamiento de la línea media (OR 34,4) [100].

Recientemente se han publicado trabajos en los que se evalúa de forma simultánea un panel de biomarcadores que participan en la patogenia de la isquemia cerebral. En uno de estos estudios se ha encontrado una relación del ictus con la proteína astrogliol S100b, factor de crecimiento neurotrófico tipo B, FVW, MMP-9 y MCP-1 [101], de tal modo que valores de 3 de ellos por encima de sus respectivos puntos de corte tienen una sensibilidad y especificidad del 93% para el diagnóstico de ictus isquémico. Un estudio posterior estableció una elevada correlación del ictus con otros biomarcadores, MMP-9, FVW y VCAM, con una sensibilidad y especificidad del 90% para predecir ictus, definido como la presencia de síntomas neurológicos focales de más de 24 horas de evolución [102].

Laskowitz y cols. estudiaron 130 pacientes con déficits neurológicos focales de menos de 6 horas de evolución, analizando un modelo predictivo que incluía péptido natriurético atrial, proteína C reactiva, dímero D, MMP-9 y proteína astrogial S100b. Los resultados mostraron una sensibilidad del 81% y una especificidad del 70% para el diagnóstico de ictus [103]. Lamentablemente estos resultados no se replicaron posteriormente en un estudio prospectivo, ya que los valores de sensibilidad y especificidad fueron peores [104], pero esta es una importante vía de estudio que podría mejorar de forma notable la capacidad de diagnóstico para los pacientes con isquemia cerebral.

También hay numerosos estudios que relacionan el subtipo etiológico de ictus con la presencia de determinados biomarcadores. Por ejemplo, se han determinado niveles más elevados de proteína C reactiva en pacientes con enfermedad aterosclerótica de grandes vasos que en aquellos con enfermedad de pequeño vaso [105], y en pacientes con estenosis extracraneal respecto a aquellos con estenosis intracraneal.

Otro trabajo publicado recientemente pone de manifiesto que los niveles de IL-6 son mayores en pacientes con estenosis intracraneal de grandes vasos que en aquellos que no la tienen. Además, los pacientes con concentraciones de IL-6 en el tercil superior tenían una mayor OR de aterosclerosis intracraneal de grandes vasos que aquellos en el tercil inferior (OR 3,25) [106].

Se ha reportado también que los pacientes con ictus de etiología cardioembólica tienen niveles más elevados de IL-6, IL-1 β y TNF- α , que aquellos con ictus lacunar [75,107].

En un interesante trabajo realizado por Montaner y cols. se estudió un panel de 10 biomarcadores (proteína C reactiva, dímeroD, receptor soluble de productos finales de glicosilación avanzada, MMP-9, S100b, péptido natriurético cerebral, neurotrofina 3, caspasa, quimerina y secretagolina) en pacientes con ictus de menos de 24 horas de evolución, y se encontró que los pacientes con ictus cardioembólico tenían niveles elevados de péptido natriurético cerebral, receptor soluble de productos finales de glicosilación avanzada y dímero D [108].

3.3. Biomarcadores de tamaño del infarto cerebral

El resultado final de la isquemia depende de factores vasculares, hemodinámicos y metabólicos, y hay variedad de marcadores plasmáticos que se han relacionado con el volumen final del infarto cerebral. Varios marcadores inflamatorios podrían ser utilizados como herramientas útiles para predecir el tamaño del infarto.

Así, se ha puesto de manifiesto que niveles elevados de IL-6 en plasma se correlacionan con mayores volúmenes de infarto [109,110], aunque algún estudio encuentra una relación opuesta [111]. También se ha encontrado correlación positiva entre las concentraciones de proteína C reactiva y el número de leucocitos y el volumen del infarto [112].

En otros casos se ha objetivado que moléculas marcadoras de daño endotelial también tienen una relación directa con el tamaño del infarto, como la MPP-9 [113] o la proteína astrogial S100b [114,115].

3.4. Biomarcadores pronósticos

3.4.1. *De deterioro neurológico precoz*

El ictus progresivo está ocasionado por la conversión de la zona de penumbra isquémica en una zona de lesión irreversible. Datos clínicos y experimentales han demostrado la participación de los mecanismos inflamatorios en el deterioro neurológico precoz (DNP), siendo el glutamato el principal predictor de la progresión del infarto. Concentraciones de glutamato por encima de 200 $\mu\text{mol/l}$ en plasma y de 8,2 $\mu\text{mol/l}$ en líquido cefalorraquídeo (LCR) han demostrado ser predictores independientes de DNP en la fase aguda del infarto cerebral hemisférico [116]. También se ha demostrado que niveles bajos de GABA son predictores de deterioro neurológico en las primeras 48 horas en pacientes con infartos lacunares [117].

Además de los aminoácidos existen otros mecanismos secundarios a la liberación de glutamato que permiten explicar el aumento progresivo de zonas no viables, que conllevan el aumento del volumen del infarto y explican el empeoramiento clínico. En este sentido se ha publicado que concentraciones elevadas de IL-6 son un potente predictor de DNP [118].

3.4.2. De infarto maligno

El infarto cerebral maligno de ACM es una situación clínica de extrema gravedad, secundaria a una obstrucción en el territorio de la ACM, en el que se desarrolla un intenso edema cerebral y que se asocia a una tasa de mortalidad cercana al 75%. Es por esto que sería importante conocer predictores para ayudar a detectar a los pacientes en mayor riesgo de desarrollar esta complicación, y poder así establecer un tratamiento óptimo lo antes posible.

Un estudio demostró que en pacientes con infarto de ACM los niveles de proteína S100b son más elevados en los que tienen una evolución a infarto maligno. En este mismo trabajo se objetivó que niveles de esta proteína por encima de 0,35 µg/l a las 12 horas del inicio de los síntomas predecían la aparición de infarto maligno con unas elevadas sensibilidad y especificidad, del 75 y 80% respectivamente, y más aún a las 24 horas del inicio (94% y 83% respectivamente) [119].

Otros trabajos realizados por científicos españoles han relacionado la proteína MMP-9 con el riesgo de desarrollar infarto maligno. En un caso, la determinación basal y seriada de las concentraciones de esta proteína detectó a los pacientes en riesgo [52], y en otro se objetivó que niveles plasmáticos de MMP-9 ≥ 140 pg/ml predicen el desarrollo de infarto maligno de ACM con una sensibilidad del 64% y una especificidad del 88% [120].

3.4.3. De transformación hemorrágica

El tratamiento con el activador tisular del plasminógeno recombinante (rTPA) es el principal tratamiento activo para los pacientes con infarto cerebral. Sin embargo una de sus principales complicaciones y limitantes para su uso clínico [121] es el riesgo de transformación hemorrágica (TH). La pérdida de la integridad de la BHE es determinante para la aparición de esta complicación [122], y en concreto la disfunción de la lámina basal endotelial secundaria a la activación de MMP [123], que ocasiona la degradación de diversos componentes de dicha estructura, tales como la laminina y la fibronectina.

Diversos estudios clínicos han demostrado relación entre niveles elevados de MMP-9 y el riesgo de desarrollar TH. En uno de ellos se determinó que niveles elevados de MMP-9 ($\geq 191,3$ ng/ml) previos a la administración de tratamiento

trombolítico eran un importante predictor de TH posterior al tratamiento, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 78% [124]. Otro estudio en pacientes con infarto cerebral no tratados con trombolítico, evidenció que niveles de MMP-9 \geq 140 ng/ml predecían el riesgo de TH con una sensibilidad y especificidad del 87% y 90% respectivamente [125].

La fibronectina celular, sintetizada principalmente por células endoteliales [126] es otro marcador que se ha relacionado con la TH del infarto cerebral, así como la proteína S100b [127] y distintos componentes de la cascada de coagulación, tales como el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) y el inhibidor de fibrinólisis activado por trombina [128].

3.4.4. De pronóstico funcional

Muchos de los biomarcadores que se han señalado previamente están relacionados de cierta manera con el pronóstico funcional de los pacientes que han sufrido una isquemia cerebral, ya que el tamaño del infarto, el deterioro neurológico precoz o la existencia de infarto maligno, entre otros, se correlacionan con un peor pronóstico. Pero además algunas de estas moléculas o marcadores hemostáticos se han relacionado de forma directa con la situación clínica.

Se ha visto que el número de leucocitos y la proteína C reactiva desde el primer día y la temperatura a partir del 2º día, se relacionan con la puntuación en la escala de ictus del National Institute of Health (NIHSS) al ingreso [112]. También se ha descrito una mortalidad intrahospitalaria mayor en pacientes con infarto cerebral y con un recuento leucocitario elevado (por encima de 9.700/ μ l; OR 8,26) [129].

Diversos estudios han valorado un conjunto de biomarcadores y variables hemáticas y clínicas, evidenciándose una relación de la proteína C reactiva [76,130] y del dímero D con una mayor probabilidad de muerte o dependencia [76]. Es probable que la proteína C reactiva sea un predictor pronóstico por su papel como indicador de aterosclerosis y su papel en la inflamación, pero también como marcador de complicaciones secundarias a la isquemia cerebral.

También la velocidad de sedimentación globular (VSG) es otro factor que se relaciona con mal pronóstico funcional, y así cifras de VSG por encima de 13mm/h en hombres o de 20mm/h en mujeres se asocian con mayor posibilidad de dependencia,

considerada como un valor de la escala de Rankin modificada (mRS) ≥ 3 a los 6 meses del evento isquémico [67].

Otros marcadores de inflamación como la IL-6 o el TNF- α también han sido ampliamente estudiados como marcadores de pronóstico funcional en el infarto cerebral. Así se ha visto que niveles elevados de IL-6 se relacionan con un mal pronóstico clínico [71,131], y también que los pacientes que no mejoraron clínicamente tenían niveles mayores de dicha interleuquina [71]. En este mismo estudio se demostró que los niveles de TNF- α eran mayores en los pacientes con infarto lacunar que tenían una afectación moderada-severa (NIHSS ≥ 6).

Se ha estudiado la variación temporal de los biomarcadores en función del pronóstico de los pacientes, demostrándose que hay diferencias significativas en los niveles de IL-6 y de MCP-1 a las 6 horas del inicio de los síntomas entre los pacientes con ictus severo y aquellos con una afectación leve-moderada [132].

Por todo lo expuesto anteriormente se puede afirmar que los biomarcadores pueden ser útiles como ayuda para determinar el pronóstico funcional.

4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

4.1.Generalidades

El ictus es una enfermedad multifactorial, en la que junto con otros factores también influyen componentes genéticos, pero sin poder definir un patrón de herencia clásico. A este respecto cabe decir que hay evidencias en gemelos, familias y en modelos animales, que de forma consistente demuestran una influencia genética para sufrir una enfermedad cerebrovascular [133].

Se han identificado algunos síndromes, entre cuyos síntomas se incluye la isquemia cerebral, que tienen una herencia mendeliana [134], pero sin embargo la mayoría de los genes estudiados en las formas de ictus más habituales no ofrecen resultados consistentes [135].

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son mutaciones de sustitución de un nucleótido por otro, y gracias a ellos podemos identificar diferencias en el

genoma de los seres vivos. Si bien existen varias metodologías para detectar estas variantes genéticas, los avances en biotecnología nos permiten detectar una gran cantidad de SNP en un solo ensayo de forma sencilla, como es el caso de los “microarray” de ADN, y avanzar en el conocimiento de algunas enfermedades.

Se han estudiado múltiples polimorfismos que relacionan la inflamación y el ictus isquémico, siendo algunos de los más replicados aquellos relativos a la IL-1, IL-6 o TNF- α .

No existen grandes estudios de polimorfismos relacionados con el infarto cerebral que hayan sido replicados en distintas poblaciones, ya que es difícil obtener poblaciones homogéneas. Por una parte existen diferencias en la incidencia de ictus entre distintos grupos étnicos, lo que probablemente esté en relación con su componente genético, pero también con una diferente distribución de factores ambientales (dieta, ejercicio...) Además, varios de los estudios realizados combinan infarto isquémico o hemorrágico, o varios subtipos etiológicos dentro de los ictus isquémicos [14].

Los aspectos genéticos de la isquemia cerebral son muy complejos, y en ellos intervienen varios *loci* que modulan diversos procesos fisiopatológicos y en donde cada uno de ellos confiere un riesgo determinado. Algunos de los alelos patogénicos estudiados aumentan la predisposición a un tipo determinado de ictus, ya que afectan a algún factor de riesgo concreto, tales como el grosor íntima-media (GIM) [136], o el riesgo de cardiopatía isquémica [137].

4.2. Polimorfismos del gen de la IL-6

El gen de la IL-6 en humanos se encuentra situado en el brazo corto de cromosoma 7 (7p21), mientras que el gen de su receptor (IL-6R α) se sitúa en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21) [138].

En los últimos años, se han descrito distintos polimorfismos de la región promotora del gen de la IL-6, como son el -572GC, el -373AT, el -597GA y el -174GC, siendo este último el de mayor prevalencia e importancia biológica.

Existen tres genotipos para este polimorfismo: GG, GC y CC, que parecen afectar a la transcripción de la citoquina [139]. El genotipo GC presenta la prevalencia más elevada en la mayoría de estudios poblacionales realizados hasta el momento.

Como se ha expuesto previamente, los niveles de IL-6 se pueden asociar con la enfermedad cerebrovascular. Diversos estudios han relacionado el polimorfismo -174GC del gen de la IL-6 con esta enfermedad. Se ha promulgado que la sustitución de un par de bases en la región del promotor del gen de la IL-6 regula la transcripción del gen y por tanto regula la concentración de IL-6 en el plasma, con el consiguiente efecto proinflamatorio. Estudios llevados a cabo en población española determinaron que los pacientes con ictus de etiología lacunar presentan una mayor frecuencia del genotipo CC en posición 174 del promotor del gen de la IL-6 [140,141]. Por el contrario, otros trabajos relacionan el alelo G del citado polimorfismo con la cardiopatía isquémica [137] o con el infarto cerebral [142].

El alelo C se ha asociado en ocasiones con una mayor expresión del gen de la IL-6 y con niveles más altos de dicha interleuquina [143], mientras que otros trabajos relacionan ese alelo con niveles más bajos de IL-6 [144], o no encuentran diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 en grupos con diferentes genotipos [145].

También se ha descrito una relación de los diferentes genotipos con la gravedad de la isquemia cerebral. Un estudio en pacientes jóvenes con isquemia cerebral (ictus o isquemia transitoria) puso de manifiesto que aquellos pacientes con discapacidad severa a la semana y a los 3 meses del evento vascular (mRS 4-5 y NIHSS \geq 6) tenían una mayor frecuencia del genotipo GG [146].

Estos resultados discrepantes pueden ser el resultado de la compleja fisiopatología de la IL-6, además de las diferencias entre diversos tipos de ictus, entre diferentes poblaciones y distintas metodologías de los estudios.

Además, las asociaciones con el polimorfismo del promotor de la IL-6 son difíciles de interpretar ya que la IL-6 tiene una compleja regulación de transcripción y además tiene acciones proinflamatorias y antiinflamatorias según las ocasiones. En general, tal y como se ha expuesto previamente, se considera una molécula proinflamatoria (participa en la liberación de adhesinas y metaloproteinasas, favorece la migración leucocitaria y la rotura de la BHE), pero también tiene acciones antiinflamatorias, como la producción del IL-1ra y del TNF- α p55, antagonista del TNF- α [147]. Por otra parte, la regulación de la transcripción de la IL-6 puede ser diferente en diferentes líneas celulares [148].

Todo esto hace pensar que es plausible que la expresión de la IL-6 y sus efectos sean diferentes en función del tipo de ictus y de las poblaciones estudiadas [149].

4.3. Polimorfismos del gen de la IL-1

Existen evidencias de que los polimorfismos relacionados con los genes de la IL-1 se asocian de diversas maneras con el infarto cerebral.

El gen de la IL-1 ha sido mapeado en el cromosoma 2q13-q21, y es parte de un grupo de genes que comprenden el de la IL-1 α , IL-1 β y el del IL-1ra.

Se han descrito varios polimorfismos en estos genes [150]. En el gen de la IL-1 α se ha descrito un polimorfismo constituido por un cambio de base en posición 889 de la región del promotor [151] y en el gen de la IL-1 β se han descrito varios polimorfismos de cambio de base, en posición 511 de la región del promotor o en posición + 3954, entre otros [152-155].

Los polimorfismos en la región del promotor, -511CT y -31TC, parecen aumentar el riesgo de cáncer gástrico, probablemente mediante un mecanismo inflamatorio mediado por IL-1 β [156]. También se ha asociado el polimorfismo -511CT con la enfermedad meningocócica [157]. Asimismo se han relacionado estos y otros polimorfismos del gen de la IL-1 con enfermedades inflamatorias y otras enfermedades, como la demencia tipo Alzheimer [158,159]. Algunos estudios han puesto de manifiesto que el alelo T en el exón 5 del gen IL-1 β (C3954T) se relaciona con un aumento de la secreción de IL-1 β [160]. Teniendo en cuenta el aspecto inflamatorio de la enfermedad cerebrovascular, se ha relacionado el infarto cerebral con los polimorfismos del gen de la IL-1 β .

Existen estudios contradictorios a este respecto: mientras algunos no encuentran relación de estos polimorfismos con el infarto cerebral [161-163], otros sí lo hacen, con el ictus en general o con algún subtipo determinado. Se ha demostrado una mayor frecuencia del alelo T (genotipos TT y CT) en posición -889 en pacientes con infarto cerebral que en controles [164].

En un estudio reciente se ha estudiado la relación del polimorfismo -511CT IL-1 β con el infarto cerebral según su etiología, y se ha demostrado una asociación del alelo T con el ictus de pequeño vaso, demostrando que el genotipo TT era un factor de

riesgo independiente para este subtipo de infarto cerebral (OR 2,40; IC 95%: 1,17-4,94) [165].

4.4. Polimorfismos del gen del TNF- α

El gen del TNF- α está localizado en el cromosoma 6p21.3, que codifica un polipéptido procesado desde un precursor de 233 aminoácidos.

Se han descrito diversos polimorfismos en el promotor del TNF- α , que pueden afectar a la unión de factores de transcripción, controlar la actividad del promotor y modificar los niveles de mRNA y de proteína [166].

De estos polimorfismos, uno de los que más se ha relacionado con la enfermedad cardiovascular es el -308GA. Estudios *in vitro* han demostrado que el alelo -308A en homocigosis se asocia con una mayor actividad de transcripción, en comparación con el genotipo GG [167].

Algunos trabajos han evidenciado que la variante -308A se asocia con mayores niveles de proteína C reactiva [168], con niveles más elevados de tensión arterial y con un aumento del riesgo de obesidad [169]. También se han estudiado asociaciones de este polimorfismo con el riesgo de infarto cerebral, sin embargo los resultados son contradictorios [170-172]. En un metaanálisis reciente se concluye que hay un aumento de riesgo de ictus en personas jóvenes de población europea con el alelo A (AA+AG vs GG), mientras que en adultos de raza asiática el alelo A se asocia con un menor riesgo de ictus [173].

El polimorfismo -238GA en el promotor del gen del TNF- α también ha sido estudiado en su relación con enfermedades inflamatorias sistémicas, tales como la sarcoidosis [174] o la psoriasis, asociándose el fenotipo -238AG con una mayor expresión de citoquina [175].

También se ha puesto de manifiesto la relación de este polimorfismo con la enfermedad cerebrovascular, aunque los resultados han sido variables. Así, en un trabajo reciente no se encontró relación de dicho polimorfismo con la isquemia cerebral [171], mientras que otros estudios han relacionado el genotipo AG con un mayor riesgo de resangrado en pacientes con malformaciones arteriovenosas [176].

Otros trabajos han estudiado la relación de diversos polimorfismos del gen del TNF- α con el subtipo etiológico del ictus, encontrando relación del alelo A en posición -238 del promotor del gen del TNF- α con el ictus de etiología aterosclerótica [177].

4.5.Otros polimorfismos

Se han estudiado otros polimorfismos relacionados con moléculas proinflamatorias en su asociación con el grosor íntima-media (GIM) en pacientes con infarto cerebral. En algún trabajo [136] se concluye que los pacientes portadores del alelo A y C de los polimorfismos A-2578G y G-927C, respectivamente, del gen de la MCP-1 tienen un mayor GIM.

Sin embargo otros trabajos revelan resultados diferentes: no relación evidente entre el polimorfismo A-2578G y el GIM [178] o relación del alelo -2578G con un aumento de la progresión del GIM en pacientes con VIH [179], lo que como hemos dicho con anterioridad puede estar en relación con las diferencias entre las poblaciones estudiadas o por la coexistencia de diversos mecanismos implicados.

5. ESTATINAS EN EL ICTUS ISQUÉMICO

5.1.Efectos clásicos

Las estatinas son análogos estructurales de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), una enzima fundamental en la síntesis del colesterol. La acción inicialmente descrita para estos compuestos fue que actuaban sobre el metabolismo del colesterol por la inhibición de la HMG-CoA reductasa, lo que limita el paso de HMG-CoA a mevalonato. Además inducen un aumento de los receptores para LDL, de la extracción hepática de precursores de LDL (VLDL) y también se ha visto actividad sobre el metabolismo de los triglicéridos y de las HDL, que es variable para cada estatina [180,181]. Se cree que estos efectos lipídicos de las estatinas reducen la progresión de la aterosclerosis, mediada en parte por la recaptación de LDL, que constituye el *core* de la placa de ateroma [182].

La disminución de los niveles de LDL colesterol es, por tanto, uno de los principales mecanismos a través de los que las estatinas reducen el riesgo de ictus [183], aunque no el único. La bajada de niveles de LDL disminuye la progresión de la estenosis carotídea, con lo que se disminuye la incidencia de ictus aterotrombótico, pero además disminuye la incidencia de infarto de miocardio, con la consiguiente reducción en las complicaciones tromboembólicas derivadas de ello.

Además de estas posibles vías de actuación, diferentes estudios sugieren que debe haber otros efectos más allá de la simple disminución de los niveles de lípidos que contribuyan al efecto beneficioso de las estatinas en la isquemia cerebral, ya que al comparar grupos de pacientes con cifras similares de colesterol, aquellos tratados con estatinas tienen mejores resultados que pacientes sin este tratamiento [184,185]. Además, a pesar de que el LDL no es uno de los principales factores de riesgo de la isquemia cerebral, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de la HMG-CoA sintetasa disminuye el riesgo de ictus hasta un 25% [186-188]. Estos otros posibles efectos son los conocidos como efectos pleiotrópicos.

5.2.Efectos pleiotrópicos

Parece evidente que la reducción de los niveles de colesterol es el mecanismo fundamental por el que las estatinas tienen efectos beneficiosos en la enfermedad vascular. Sin embargo, añadido a su efecto directo sobre la síntesis de colesterol, las estatinas disminuyen la expresión de algunos compuestos intermedios, como el farnesil pirofosfato o el geranilgeranilpirofosfato, lo que ocasiona una menor translocación a la membrana celular de pequeñas proteínas de señalización, proteínas unidoras de GTP (Rho, Ras, Rap, Roc, Rab) [189], lo que disminuye la transcripción de determinados genes y por tanto reduce la formación de varias proteínas implicadas en la cascada de la coagulación, la inflamación o la proliferación. Además, a través de la inhibición del complejo Rho/Rho-quinasa hay una mayor formación de óxido nítrico (NO) que ocasiona una mejora de la función endotelial [190].

A continuación se detallan las acciones más importantes de las estatinas más allá de su capacidad para disminuir los niveles de lípidos, a saber: acciones sobre la función endotelial, sobre la proliferación de células de músculo liso, sobre la función de las

plaquetas, sobre la estabilidad de la placa, sobre los procesos inflamatorios, protección contra radicales libres y acción sobre la plasticidad neuronal [181,191].

5.2.1. Acción sobre la función endotelial

Una de las primeras manifestaciones de la aterosclerosis es la disfunción endotelial, caracterizada, entre otras cosas, por la alteración de la síntesis, liberación y actividad del NO derivado del endotelio. La isoforma inducible de la sintasa de NO (NOSi) se considera mediadora de respuestas inflamatorias en los procesos de isquemia-reperusión [194], mientras que la forma endotelial (NOSe) se considera protectora.

El NO derivado de endotelio inhibe algunos procesos de la aterogénesis, ya que interviene en la relajación vascular, inhibe la agregación plaquetaria, la proliferación de músculo liso vascular y las interacciones entre endotelio y leucocitos. Estudios experimentales con estatinas demuestran que tienen capacidad para aumentar la expresión la NOSe e inhibir la NOSi, lo que protegería el endotelio cerebral y atenuaría el daño isquémico [193,194]. En el endotelio la translocación de Rho del citoplasma a la membrana depende de la geranilgeranilación. La activación de Rho y de proteínas relacionadas inhibe la actividad de la NOSi [195], y por lo tanto la inhibición de Rho aumenta la expresión de la NOSe, mediado por una alteración de la conformación del citoesqueleto de la actina [196].

5.2.2. Acción sobre la proliferación de células de músculo liso

La proliferación de las células de músculo liso vascular es un evento importante en la patogénesis de las lesiones vasculares. La inhibición de isoprenoides mediada por las estatinas disminuye la síntesis de ADN mediada por el PDGF en las células de músculo liso vascular [197]. Parece que las estatinas bloquean el ciclo celular en la transición entre la fase G1 y a fase S, lo que probablemente esté mediado por la inhibición de la proteína Rho [198].

5.2.3. Acción sobre la función de las plaquetas

Se ha demostrado que las estatinas inhiben la función plaquetaria. Los mecanismos que se postulan como mediadores de dicha inhibición son la reducción en la producción de tromboxano A₂, la modificación del contenido de colesterol de las membranas de las plaquetas [199] y la inhibición de la expresión de FT por los macrófagos [200].

5.2.4. Acción sobre la estabilidad de la placa

Además del efecto estabilizador de placa secundario a la disminución de los niveles de lípidos, las estatinas contribuyen a estabilizar la placa de ateroma disminuyendo la expresión de metaloproteinasas y de FT [200], lo que hace que se reduzca el riesgo de rotura de la placa.

5.2.5. Acción sobre los procesos inflamatorios

Diversos estudios han puesto de manifiesto que los niveles de proteína C reactiva disminuyen en pacientes hipercolesterolémicos tratados con estatinas [201,202], lo que además hizo salir a la luz un potencial efecto antiinflamatorio de dichos fármacos. No está claro cual es el mecanismo antiinflamatorio, pero parece mediado por la inhibición de moléculas de adhesión, como la ICAM-1, implicada en el reclutamiento de células inflamatorias [203], por la disminución de la interacción entre leucocitos y endotelio secundario a la disminución de la isoprenilación de proteínas G leucocitarias y a la disminución de la formación de dímeros dependientes de isoprenoides en moléculas como CD11b/CD18 monocitaria [204].

Un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento con estatinas en pacientes que van a ser sometidos a endarterectomía carotídea disminuye los niveles plasmáticos de LDL y de prostaglandina E₂, además de que las células mononucleares sanguíneas tienen una disminución de la activación del NF-κB y de la expresión del mRNA de MCP-1 y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Asimismo se demuestra una reducción de la infiltración por macrófagos en la placa de ateroma, del NF-κB activado y de la expresión de COX-2 y MCP-1 [205].

5.2.6. *Protección contra radicales libres*

La liberación de radicales libres después de la isquemia puede aumentar el tamaño de la zona de penumbra. Dichos radicales libres dañan las células principalmente por peroxidación lipídica y oxidación proteica y de ácidos nucleicos. Algunos estudios con estatinas indican que pueden reducir la peroxidación lipídica y disminuir la lesión por radicales libres, ya que los metabolitos hidroxilo de la atorvastatina favorecen la antioxidación preservando la función de la superóxido dismutasa [189].

5.2.7. *Acción sobre la plasticidad neuronal*

Existen estudios que ponen de manifiesto que algunas estatinas pueden potenciar la recuperación funcional e inducir plasticidad neuronal. La atorvastatina administrada tras la isquemia cerebral favorece un aumento de la angiogénesis, la proliferación celular endógena y la neurogénesis [206]. La plasticidad promovida por estatinas se relaciona con la regulación de del factor de crecimiento endotelial vascular y del factor neurotrófico derivado de cerebro [207].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existe evidencia de que la inflamación juega un papel importante en la patogenia de la isquemia cerebral. Sin embargo, algunas teorías plantean que este efecto no es siempre deletéreo, sino que pudiera tener algún efecto beneficioso en el organismo [58]. Como resultado de la isquemia cerebral se liberan en la sangre determinadas sustancias implicadas en la respuesta inflamatoria tales como la IL-1 α , IL-1 β IL-6, TNF- α , fibrinógeno o proteína C reactiva, entre otras [54,55].

Por otro lado, el estudio de las moléculas inflamatorias y de los polimorfismos en los genes que codifican para dichas moléculas, podría ayudar a mejorar el conocimiento de los mecanismos relacionados con la isquemia cerebral y a conocer mejor el pronóstico de la enfermedad cerebrovascular isquémica. Algunos de estos polimorfismos se han asociado con diferentes subtipos de ictus y con la evolución clínica de los pacientes [140,141].

En esta línea, hay que destacar las propiedades antiinflamatorias de las estatinas, fármacos muy importantes en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad cardio y cerebrovascular y cuyo uso podría modificar la evolución de los pacientes con ictus.

Este trabajo de investigación se plantea con la finalidad de valorar si los niveles plasmáticos de moléculas relacionadas con la inflamación y determinados polimorfismos en los genes que codifican para estas moléculas, se asocian con la gravedad del infarto y con el pronóstico funcional de los pacientes con isquemia cerebral. Además se pretende valorar si existe relación entre los niveles de dichas moléculas inflamatorias y la gravedad, el pronóstico funcional y el tratamiento previo con estatinas.

Por tanto, basándonos en los planteamientos anteriores, la **hipótesis** de este trabajo de investigación parte de que los niveles plasmáticos más elevados de moléculas inflamatorias reflejan un mayor daño neuronal y por tanto una mayor gravedad y peor pronóstico funcional de los pacientes con isquemia cerebral. Además, conocidos los mecanismos antiinflamatorios de las estatinas, se puede pensar que los pacientes en tratamiento previo con estos fármacos pudieran tener niveles menores de moléculas inflamatorias y mejor pronóstico funcional.

Para confirmar esta hipótesis se plantean los siguientes **objetivos**:

1. Caracterizar la población estudiada de pacientes con infarto cerebral agudo en relación con sus factores de riesgo vascular y características del infarto.
2. Evaluar la relación entre las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, leucocitos, IL-6, IL-1 α , IL-1 β y TNF- α en las primeras 24 horas de evolución de pacientes con infarto cerebral, con la gravedad del infarto y el pronóstico funcional, aplicando la escala de NIHSS y la escala de Rankin modificada, respectivamente.
3. Analizar la distribución de polimorfismos de los genes que codifican para IL-6, IL-1 α , IL-1 β y TNF- α en una población de pacientes con infarto cerebral y en una población control. Evaluar si existe relación entre los diferentes polimorfismos, la gravedad del infarto y el pronóstico funcional de los pacientes con ictus.
4. Analizar las concentraciones de leucocitos, fibrinógeno, IL-6, IL-1 α , IL-1 β y TNF- α en pacientes con y sin tratamiento con estatinas previo a sufrir la isquemia cerebral. Valorar si este tratamiento se asocia con la gravedad del infarto y con el pronóstico funcional.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En el presente trabajo se ha desarrollado un estudio clínico descriptivo, prospectivo y transversal. La población analizada está constituida por un grupo de pacientes con ictus isquémico de menos de 24 horas de evolución. Se incluyó en el estudio un grupo control de personas sin antecedentes trombóticos, emparejados por sexo y edad (± 5 años) con los casos. La selección de ambos grupos se realizó según los criterios de inclusión detallados en el apartado correspondiente.

La realización de este trabajo se ha ceñido estrictamente a la declaración de Helsinki y a las leyes de protección de datos (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal) y de protección de los derechos de los pacientes (Ley 15/2002).

Este estudio ha sido evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, donde se han realizado los estudios.

2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

2.1. Casos con infarto cerebral. Criterios de selección

En el grupo de estudio se incluyeron de manera prospectiva un total de 92 pacientes con diagnóstico de infarto cerebral ingresados en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Todos los pacientes tenían una evolución de los síntomas menor o igual a 24 horas. Se excluyeron aquellos casos con enfermedades autoinmunes o tumorales conocidas y los que hubieran sido diagnosticados de algún proceso infeccioso en la semana previa.

2.1.1. Diagnóstico de infarto cerebral

Todos los pacientes fueron valorados al ingreso por un neurólogo. El diagnóstico de infarto cerebral se realizó ante la presencia de síntomas y/o signos neurológicos focales persistentes, de inicio súbito, una vez excluidas otras causas potenciales, y con

una técnica de imagen cerebral (TAC y/o resonancia magnética -RM-) normal o con signos de isquemia.

A todos los pacientes se les practicó un TAC al ingreso, determinándose la presencia o ausencia de signos precoces de infarto [208].

Para identificar el mecanismo potencial del ictus, todos los pacientes fueron estudiados con al menos una técnica de neuroimagen (TAC y/o RM cerebral), así como con electrocardiograma, radiografía de tórax, ecografía doppler de troncos supraaórticos, hemograma y parámetros bioquímicos. En los casos indicados, según el protocolo vigente, se realizaron además estudio de trombofilia, estudio de autoinmunidad, serologías, ecocardiograma, monitorización electrocardiográfica continua y/o angiografía cerebral.

2.1.2. Clasificación etiológica del infarto cerebral

Con la información obtenida de cada paciente según lo descrito en el apartado 2.1.1, los ictus se clasificaron etiológicamente siguiendo los criterios TOAST [209], con la clasificación adaptada del Laussane Stroke Registry [210] y del comité *ad hoc* del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN [211,212] en: infartos lacunares, aterotrombóticos (con o sin estenosis), cardioembólicos, de causa poco habitual o de causa indeterminada. La definición de cada subtipo fue:

- Aterotrombótico o por arteriosclerosis de grandes vasos: infarto de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical, carotídea o vertebrobasilar en un paciente con uno o varios factores de riesgo vascular. Puede ser con estenosis (se objetiva una estenosis mayor o igual del 50% del diámetro de la arteria extracraneal correspondiente o de una arteria intracraneal de gran calibre) o sin estenosis (placas de ateroma que ocluyen menos del 50% y en presencia de dos o más factores de riesgo entre edad mayor de 50 años, HTA, DM, tabaquismo o DL).

- Cardioembólico: infarto de tamaño medio o grande, de topografía frecuentemente cortical en el que se evidencia alguna cardiopatía embolígena.

- Lacunar o enfermedad arterial de pequeño vaso: infarto de pequeño tamaño (<1,5 cm) en un territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar un síndrome lacunar, a saber, hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro,

síndrome sensitivo-motor, hemiparesia-ataxia o disartria-mano torpe, en un paciente con antecedentes de HTA u otros factores de riesgo vascular.

- De causa rara: infarto de cualquier tamaño, de topografía cortical o subcortical, carotídeo o vertebrobasilar, una vez descartadas las causas anteriores y que está producido por enfermedades sistémicas (conectivopatías, neoplasias, alteraciones metabólicas, alteraciones de coagulación...), disección arterial, displasia fibromuscular, trombosis venosa cerebral, migraña, etc.

- De origen indeterminado: infarto de cualquier tamaño, cortical, subcortical, carotídeo o vertebrobasilar en el que se han descartado los subtipos anteriores o aquellos en los que existe más de una causa posible. También se clasifican como indeterminados aquellos infartos en los que no se encuentra una causa porque el estudio ha sido incompleto.

2.2. Grupo control. Criterios de selección

El grupo control estaba constituido por 262 personas que se emparejaron por sexo y edad (± 5 años) con los pacientes. La selección de este grupo control se realizó mediante la revisión del historial clínico de pacientes que ingresaron en diferentes servicios del hospital, sin historia previa ni actual de trombosis venosa ni arterial. Asimismo se excluyeron los pacientes con antecedentes de neoplasia y aquellos que estaban en tratamiento anticoagulante.

La estrategia de selección de controles se hizo para facilitar la recogida de datos en un corto período de tiempo y de manera eficiente de cara a emparejarlos con los casos.

3. MUESTRAS EXTRAÍDAS

De todos los pacientes se obtuvieron por venopunción las siguientes muestras de sangre periférica:

- Una muestra de 3 ml de sangre venosa en anticoagulante EDTA K3 que se procesó para realizar el hemograma.

- Una muestra de 4,5 ml de sangre venosa en citrato sódico al 3,8%, que se procesó mediante centrifugación a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga Labofuge 400 (Heraeus, Alemania) durante 10 minutos. El plasma obtenido se procesó inmediatamente para la determinación de fibrinógeno Clauss.

- Una muestra de 5 ml de sangre venosa en tubo sin anticoagulante, que se procesó mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. El suero obtenido se utilizó para la determinación de glucosa y colesterol.

En un subgrupo de pacientes, se obtuvo además una muestra de 5 ml de sangre venosa en tubo sin anticoagulante, que se procesó según lo descrito previamente. El suero fue separado y congelado a -80°C hasta su uso y se empleó posteriormente para la determinación de citoquinas.

En este subgrupo de pacientes y en los controles se extrajo una muestra de 9 ml de sangre venosa en anticoagulante EDTA K3 que se procesó inmediatamente para la extracción del ADN genómico y para la realización de los estudios genéticos.

4. VARIABLES CLÍNICAS ANALIZADAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.1. Grupo de casos con infarto cerebral

En todos los casos se recogieron las variables demográficas de edad y sexo, y los factores de riesgo vascular. Además se analizaron la gravedad del infarto y la situación funcional al alta, así como otras variables.

4.1.1. Factores de riesgo vascular

Los factores de riesgo vascular se definieron como: HTA (cifras persistentes de TA sistólica >140mmHg, TA diastólica >90mmHg o tratados previamente con hipotensores), DM (glucemia al ingreso >200mg/dl o tratamiento hipoglucemiante previo), DL (colesterol total >220mg/dl, triglicéridos >150mg/dl o tratamiento previo con estatinas) e historia de tabaquismo (previo o activo).

4.1.2. Gravedad del infarto

La gravedad del infarto se determinó mediante la escala NIHSS al ingreso [213,214].

La escala NIHSS mide el grado de afectación neurológica mediante una puntuación de 15 aspectos. Es ampliamente utilizada tanto en estudios clínicos como en la práctica clínica habitual [215]. Evalúa el nivel de conciencia, la orientación, la comprensión de órdenes verbales, la mirada horizontal, fuerza, coordinación, sensibilidad, lenguaje y signos de extinción cortical (Anexo 1).

La puntuación basal en la escala NIHSS es un marcador de gravedad de infarto y es también un marcador de pronóstico funcional [216]. Dicha escala ha sido validada en español [217].

Se estratificó la gravedad según la puntuación NIHSS, de forma que se consideró que aquellos pacientes con puntuaciones menores de 6 padecían un ictus leve y aquellos con puntuaciones mayores o iguales a 6, moderado o grave.

La principal limitación de esta escala es que no contempla todos los déficits asociados con el infarto cerebral, fundamentalmente aquellos secundarios a isquemia en territorio vertebrobasilar [218,219], y además que las puntuaciones de los ictus en territorio de arteria cerebral media izquierda son por lo general más elevadas.

4.1.3. Situación funcional

Se determinó la situación funcional al alta mediante la escala de Rankin modificada (mRS) (Anexo 2) [220-222].

La mRS mide la situación funcional, mediante una puntuación de 7 grados, considerando 0 la situación de completa independencia y 6 la situación de muerte [220,222,223]. Esta escala es muy utilizada tanto en estudios clínicos como para medir el impacto funcional global del ictus. Su puntuación mantiene una moderada correlación con el volumen del infarto [224] y se correlaciona de forma estrecha con la puntuación en otros índices de discapacidad [225,226].

4.1.4. Otras variables

También se recogieron los antecedentes de FA y de isquemia cerebral previa. Se constató la toma de tratamiento habitual con antitrombóticos (ácido acetilsalicílico,

clopidogrel o anticoagulantes) y con estatinas. Además se determinaron al ingreso la temperatura y la presencia o ausencia de signos precoces de isquemia en el TAC craneal.

4.2. Grupo de controles

En todos los controles se recogieron los datos de filiación básicos (edad y sexo) y los factores de riesgo vascular: HTA, DM, DL y tabaquismo, que se han definido en el apartado 4.1.1.

5. VARIABLES ANALÍTICAS

5.1. Descripción general de las variables analizadas

En todos los pacientes se determinaron en las primeras 24 horas de inicio de los síntomas las cifras de leucocitos (rango normal-rn: 3.500-11.000/ μ l), plaquetas (rn: 150.000-450.000/ μ l), hematocrito (rn: 39-50%), glucemia (rn: 74-100 mg/dl) y fibrinógeno (rn: 200-400 mg/dl). Durante el ingreso se analizaron también los niveles de colesterol total y sus fracciones.

En un subgrupo de pacientes se determinaron además los niveles de IL-6, IL-1 α , IL-1 β y TNF- α (ver apartado 4.2). En este subgrupo de pacientes, y en los controles, se estudiaron los polimorfismos -174 GC del gen de la IL-6, -889 CT del gen de la IL-1 α , -511 CT y +3954 CT del gen de la IL-1 β y -238 GA del gen del TNF- α (ver apartado 6).

5.2. Estudio de citoquinas

La concentración de cada citoquina en suero se determinó mediante un ensayo ELISA (*BLK Diagnostics, España*) caracterizado por la detección de un antígeno (Ag) por unión con un anticuerpo (Ac) específico inmovilizado en una fase sólida, y posterior unión de otro Ac sobre él. El complejo Ac-Ag-Ac se determina midiendo directa o indirectamente por espectrofotometría.

En este trabajo, la determinación de citoquinas se realizó en suero atendiendo a las indicaciones del kit comercial que testaba valores similares de concentración de estas en suero y en plasma. Cada ensayo constó de cuatro fases:

1. Unión del anticuerpo de superficie (Ac primario) a los pocillos de la placa.
2. Adición del antígeno a determinar (esto es, el suero muestra) y unión de este al anticuerpo primario.
3. Adición del anticuerpo secundario y unión de este al antígeno, formando el inmunocomplejo “Ac primario-Antígeno-Ac secundario”.
4. Revelado por adición de un sustrato cromogénico y medida del color en un espectrofotómetro.

Cada ensayo utilizó un Ac primario monoclonal específico para cada citoquina a determinar, adsorbido a la superficie de cada uno de los 96 pocillos de una placa de microtitulación.

En una **primera parte** del ensayo se ajustó la concentración de los distintos tampones a la concentración adecuada según las condiciones del ensayo, se reconstituyó el estándar a partir del cual se realizaron las distintas diluciones que dieron lugar a la curva patrón, se reconstituyeron los controles y se realizó la dilución de las muestras a estudio.

A continuación, y tras varios lavados rigurosos de la placa con tampón de lavado al 1x, se procedió a la adición de las muestras a determinar por duplicado: diluciones del estándar (curva patrón), controles y muestras a determinar, de forma que reaccionasen uniéndose al anticuerpo primario.

En la **segunda parte** del ensayo se realizó un ELISA indirecto basado en el sistema de alta afinidad biotina-estreptavidina.

La biotina es una proteína de bajo peso molecular soluble en agua, que presenta un grupo carboxílico que permite su unión a los restos amino de las proteínas. La estreptavidina es una proteína tetramérica procedente de *Streptomyces avidinii*.

En este protocolo se añadió un Ac secundario biotilizado, que era además un Ac anti-citoquina a determinar, sobre el antígeno ya unido al Ac primario (curva, controles y muestras a estudio). Tras dos horas de incubación a temperatura ambiente con agitación moderada y constante de 100 rpm, se añadió la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, dejando incubar la mezcla 1 hora más, a temperatura ambiente y con agitación de 100 rpm.

En la **tercera parte** del ensayo se añadió el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina, que se incubó en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente y sin agitación.

6. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN GENES DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS

El estudio de los distintos SNP se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La detección de la diana con la mutación se llevó a cabo por RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) mediante digestión del producto de PCR con enzimas de restricción específica. El análisis de los distintos fragmentos obtenidos de la digestión se analizó por visualización en geles de agarosa con marcaje previo del ADN con bromuro de etidio.

6.1. Análisis de SNP por reacción en cadena de la polimerasa. Generalidades

La PCR constituye el primer paso para el estudio de los SNP. Esta técnica es desde un punto de vista teórico, un método sencillo para la obtención de un número elevado de copias de un fragmento de ADN. Mediante PCR podemos amplificar la región del ADN de interés, utilizando una enzima de tipo polimerasa que es termoestable, y que se obtiene de la bacteria termófila *Thermus Aquaticus* (Taq). El ADN se amplifica de forma exponencial a través de ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y elongación, al incubar una pequeña cantidad del mismo (ADN molde) con oligonucleótidos específicos (cebadores) que flanquean el segmento a amplificar, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), la propia enzima polimerasa y un tampón adecuado.

Los polimorfismos analizados en este trabajo se han llevado a cabo seleccionando de la literatura las secuencias de los cebadores adecuados.

6.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR consta de tres etapas o fases: la *fase de desnaturalización*, en la que se separa la doble cadena de ADN en dos cadenas sencillas, la *fase de anillamiento*, en la que se selecciona la temperatura de fusión adecuada para la unión del sustrato de ADN a sus cebadores y la *fase de elongación* en la que la enzima Taq ADN polimerasa replica las hebras de ADN incorporando desoxinucleótidos monofosfato a partir de los dNTP's presentes en la mezcla de reacción.

6.1.2. Reactivos y controles de la reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen total de 25 μ l. Para cada procedimiento se preparó una mezcla de reacción que contenía "n+1" veces la cantidad de los reactivos que figuran en la tabla (tabla 1), siendo "n" el número de muestras a estudiar. Cada vial de ADN contuvo la concentración de reactivo que se adjunta en la tabla 1.

Debido a la alta sensibilidad de la técnica (pueden obtenerse más de un millón de copias de la región flanqueada por los oligonucleótidos), es necesario tener un cuidado extremo en la manipulación de las muestras para evitar contaminaciones. Por ello, en todos los protocolos se incluyen dos controles, un control negativo de amplificación utilizando agua bidestilada en lugar de ADN, y un control positivo para la mutación estudiada.

Tabla 1. Características generales de los reactivos utilizados en la PCR para el estudio de los distintos SNP

PRODUCTO	CANTIDAD	CASA COMERCIAL
Cebador-1 (20 pmol/μl)	0,5	Invitrogen-Life Technologies
Cebador-2 (20 pmol/μl)	0,5	Invitrogen-Life Technologies
Tampón PCR 10x (20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, pH 8,4)	1x	Invitrogen-Life Technologies
MgCl ₂ (25 mM)	X μl según PCR	Applied Biosystems
dNTPs (2,5 mM)	2 mM	Biotools
Taq Polimerasa (5U/μl)	0,06 U/μl	Invitrogen-Life Technologies
ADN	20 ng/μl	-
H ₂ O	Hasta 25 μl	Braun

6.2. Reacción en cadena de la polimerasa para cada polimorfismo

6.2.1. Polimorfismo -174 GC para IL-6

El estudio del polimorfismo -174 GC en la región promotora del gen de IL-6 se realizó mediante PCR sobre ADN genómico utilizando la siguiente pareja de oligonucleótidos específicos de acuerdo a la literatura [227]:

- Oligonucleótido sentido: 5' TGA CTT CAG CTT TAC TCT TGT 3'

- Oligonucleótido antisentido: 5' CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG 3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μl. Para cada procedimiento se realizó una mezcla de reacción cuyas concentraciones y volúmenes de reactivos se muestran en la tabla 2. Las condiciones de PCR se describen en la tabla 3.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la PCR del SNP -174 GC en el gen de la IL-6

REACTIVO	VOLUMEN (μl)
IL-6 OLIGO SENTIDO (20 pmol/μl)	0,5
IL-6 OLIGO ANTISENTIDO (20 pmol/μl)	0,5
TAMPÓN PCR 10x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (2 mM)	2,5
Taq Polimerasa	0,3
ADN (200 ng/μl)	4
H ₂ O	12,7

Tabla 3. Condiciones de PCR para el SNP -174 GC en el gen de la IL-6

40 CICLOS	Fase de desnaturalización inicial	94°C, 4 min
	Fase de desnaturalización	94 °C, 1 min
	Fase de anillamiento	53 °C, 1 min
	Fase de elongación	72 °C, 1 min
	Fase de extensión	72 °C, 10 min
	Conservación	4°C

6.2.2. Polimorfismo -889 CT para IL-1α

El estudio del polimorfismo -889 CT en la posición -889 del gen que codifica para IL-1α se realizó mediante PCR sobre ADN genómico utilizando la siguiente pareja de oligonucleótidos específicos de acuerdo a la literatura [164]:

- Oligonucleótido sentido: 5' GGG GGC TTC ACT ATG TTG CCC ACA CTG GAC TAA 3'
- Oligonucleótido antisentido: 5' GAA GGC ATG GAT TTT TAC ATA TGA CCT TCC ATG 3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μl. Para cada procedimiento se realizó una mezcla de reacción que contenía concentración y volumen de reactivos según la tabla 4. Las condiciones de PCR se detallan en la tabla 5.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR del SNP -889 CT en el gen de la *IL-1 α*

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
IL-1 α OLIGO SENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
IL-1 α OLIGO ANTISENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
TAMPÓN PCR 10x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTPs (2 mM)	2,5
Taq Polimerasa	0,25
ADN (200 ng/ μ l)	4
H ₂ O	13,75

Tabla 5. Condiciones de PCR para el SNP -889 CT en el gen de la *IL-1 α*

35 CICLOS	Fase de desnaturalización inicial	94°C, 4 min
	Fase de desnaturalización	94 °C, 1 min
	Fase de anillamiento	58 °C, 1 min
	Fase de elongación	72 °C, 1 min
	Fase de extensión	72 °C, 10 min
	Conservación	4°C

6.2.3. Polimorfismo -511 CT para *IL-1 β*

El estudio del polimorfismo -511 CT en el gen que codifica para la *IL-1 β* se realizó mediante PCR sobre ADN genómico utilizando la siguiente pareja de oligonucleótidos específicos de acuerdo a la literatura [228]:

- Oligonucleótido sentido: 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3'
- Oligonucleótido antisentido: 5' GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT 3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Para cada procedimiento se realizó una mezcla de reacción que contenía concentración y volumen de reactivos según tabla 6. Las condiciones de amplificación para la PCR se describen en la tabla 7.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la PCR del SNP -511 CT en el gen de la IL-1 β

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
IL-1 β OLIGO SENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
IL-1 β OLIGO ANTISENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
TAMPÓN PCR 10x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTPs (2 mM)	2,5
Taq Polimerasa	0,25
ADN (200 ng/ μ l)	4
H ₂ O	13,75

Tabla 7. Condiciones de PCR para el SNP -511 CT en el gen de la IL-1 β

35 CICLOS	Fase de desnaturalización inicial	94°C, 4 min
	Fase de desnaturalización	94 °C, 1 min
	Fase de anillamiento	53 °C, 1 min
	Fase de elongación	72 °C, 1 min
	Fase de extensión	72 °C, 10 min
	Conservación	4°C

6.2.4. Polimorfismo +3954 CT para IL-1 β

El estudio del polimorfismo +3954 CT en el gen que codifica para la IL-1 β se realizó mediante PCR sobre el ADN genómico utilizando la siguiente pareja de cebadores u oligonucleótidos específicos de acuerdo a la literatura [164]:

- Oligonucleótido sentido: 5' CTC AGG TGT CCT CGA AGAAAT CAA A 3'
- Oligonucleótido antisentido: 5' GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG 3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Para cada procedimiento se realizó una mezcla de reacción que contenía concentración y volumen de reactivos según tabla 8. Las condiciones de amplificación para la PCR fueron las referidas en la tabla 9.

Tabla 8. Mezcla de reacción para la PCR del SNP +3954 CT en el gen de la IL-1 β

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
IL-1 β OLIGO SENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
IL-1 β OLIGO ANTISENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
TAMPÓN PCR 10x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTPs (2 mM)	2,5
Taq Polimerasa	0,25
ADN (200 ng/ μ l)	4
H ₂ O	13,75

Tabla 9. Condiciones de PCR para el SNP +3954 CT en el gen de la IL-1 β

40 CICLOS	Fase de desnaturalización inicial	94°C, 4 min
	Fase de desnaturalización	94 °C, 1 min
	Fase de anillamiento	59 °C, 1 min
	Fase de elongación	72 °C, 1 min
	Fase de extensión	72 °C, 10 min
	Conservación	4°C

6.2.5. Polimorfismo -238 GA para TNF- α

El estudio del polimorfismo -238 GA se realizó mediante PCR sobre ADN genómico utilizando dos oligonucleótidos específicos de acuerdo a la literatura [229,230]:

-Oligonucleótido sentido: 5' AGA AGA CCC TCG GAA CC 3'

-Oligonucleótido antisentido: 5' ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG 3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Para cada procedimiento se realizó una mezcla de reacción que contenía concentración y volumen de reactivos según la tabla 10. Las condiciones de amplificación para la PCR fueron las reflejadas en la tabla 11.

Tabla 10. Mezcla de reacción para la PCR del SNP -238 GA en el gen del *TNF- α*

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
TNF- α OLIGO SENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
TNF- α OLIGO ANTISENTIDO (20 pmol/ μ l)	0,5
TAMPÓN PCR 10x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTPs (2 mM)	2,5
Taq Polimerasa	0,25
ADN (200 ng/ μ l)	4
H ₂ O	13,75

Tabla 11. Condiciones de PCR para el SNP -238 GA en el gen del *TNF- α*

40 CICLOS	Fase de desnaturalización inicial	94°C, 1 min
	Fase de desnaturalización	94 °C, 1 min
	Fase de anillamiento	59 °C, 1 min
	Fase de elongación	72 °C, 1 min
	Fase de extensión	72 °C, 10 min
	Conservación	4°C

6.3. Análisis de restricción y visualización para cada polimorfismo

Una vez obtenido el producto de amplificación del ADN mediante PCR, se procedió al análisis de los SNP mediante el uso de endonucleasas de restricción capaces de reconocer secuencias relativamente cortas y específicas del ADN de doble cadena. La digestión de los productos amplificados se realizó según las condiciones recomendadas por el fabricante respecto al tampón, la temperatura y la duración del ensayo para que el corte fuese correcto.

Se determinó la presencia o la ausencia del alelo mutado analizando la longitud de los fragmentos originados mediante electroforesis en gel de agarosa (α -D-galactopiranososa y 3,6-Anhidro- α -L-galactopiranososa) al 3%, con tampón Tris-bórico-EDTA (*TBE*, *Bio-Rad*, *Alemania*) a concentración 1x y con bromuro de etidio (*Bio-Rad*, *Alemania*) para posterior visualización del ADN por fluorescencia.

Preparación de geles de agarosa: Se utilizó una mezcla de 1,5 g de Agarosa D-1 Low EEO (*Pronadisa, Conda, España*) y 1,5 g Agarosa MS- 8 (*Pronadisa, Conda, España*) que se añadió sobre un erlenmeyer con 100 ml de tampón TBE 1x y se llevó a ebullición en horno microondas hasta homogeneización completa. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se añadió el bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml, agitando para su disolución. Posteriormente se dejó solidificar la muestra en el soporte adecuado para la carga del ADN ya digerido. La concentración final del gel de agarosa es del 3%, indicada para separar fragmentos de ADN con un tamaño de 150 a 60 pares de bases (pb).

Electroforesis y visualización: Los distintos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis tras carga submarina de 15 µl de muestra, y aplicación de una corriente de 60V en una cubeta de electroforesis (*Ecogen, España*). El análisis del patrón de bandas se llevó a cabo frente a un patrón de 100 pb (*Invitrogen- Life Technologies, New Zealand*).

Finalmente, la detección de los fragmentos se realizó en un sistema de análisis de imagen por visión directa con luz ultravioleta en un transiluminador con un equipo de fotografía acoplado, que permitía la visualización de los resultados realizados en geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml.

6.3.1. Polimorfismo -174 GC para IL-6

El resultado de la PCR fue un producto de 190 pb sobre el que se realizó una digestión a 37 °C en incubador, con 1 µl (10 unidades/µl) de enzima de restricción NlaIII (10.000 U/ml, *R0125S, New England Biolabs, USA*) dando como resultado una banda de 190 pb cuando no se porta la mutación, dos bandas de 147 y 43 pb en el caso de ser portador homocigoto de la misma y tres bandas de 190, 147 y 43 pb si se es portador en heterocigosis.

6.3.2. Polimorfismo -889 CT para IL-1α

El resultado de la PCR fue un producto de 300 pb sobre el que se realizó una digestión a 37 °C en incubador, con 1 µl (10 unidades/µl) de enzima de restricción NcoI (10.000 U/ml, *R0193S, New England Biolabs, USA*) dando como resultado dos bandas

de 280 y 20 pb cuando se porta el alelo ancestral, tres bandas de 300, 280 y 20 pb en el caso de ser portador heterocigoto y una banda de 300 pb si se es homocigoto mutado para la misma.

6.3.3. Polimorfismo -511 CT para IL-1 β

El resultado de la PCR fue un producto de 304 pb sobre el que se realizó una digestión a 37 °C en incubador, con 1 μ l (10 unidades/ μ l) de enzima de restricción AvalI (10.000 U/ml, R0152S, New England Biolabs, USA) dando como resultado dos bandas de 190 y 114 pb cuando no se porta la mutación, tres bandas de 304, 190 y 114 pb en el caso de ser portador heterocigoto y una banda de 304 pb si se es homocigoto mutado para la misma.

6.3.4. Polimorfismo +3954 CT para IL-1 β

El resultado de la PCR fue un producto de 182 pb sobre el que se realizó una digestión a 65 °C en baño térmico, con 1 μ l (20 unidades/ μ l) de enzima de restricción Taq α I (20.000 U/ml, R0149S, New England Biolabs, USA) dando como resultado una única banda de 182 pb en ausencia de diana de restricción en los individuos con el alelo ancestral en homocigosis, cuatro bandas de 182, 97, 85 y 12 pb cuando se porta la mutación en heterocigosis y tres bandas de 182, 85 y 12 pb en el caso de portar la mutación en homocigosis.

6.3.5. Polimorfismo -238 GA para TNF- α

El resultado de la PCR fue un producto de 152 pb sobre el que se realizó una digestión a 37 °C en incubador, con 1 μ l (20 unidades/ μ l) de enzima de restricción MspI (20.000 U/ml, R0149S, New England Biolabs, USA) dando como resultado una única banda de 152 pb en ausencia de diana de restricción en los individuos que portan la mutación en homocigosis, y dos bandas de 133 y 119 cuando el individuo es portador del alelo normal en homocigosis.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las diferentes variables del estudio fueron recopilados en una base de datos del programa Excel para PC.

Se realizó un análisis descriptivo de las características demográficas (sexo y edad) y de los factores de riesgo vascular (HTA, DM, DL, tabaquismo) en el grupo de pacientes y en la población control. Para comparar las frecuencias de exposición a los factores de riesgo de pacientes y controles se calcularon las OR y sus intervalos de confianza al 95% mediante modelos de regresión logística ajustados por sexo y edad.

En cada paciente se llevo a cabo también un análisis descriptivo de las variables clínicas (TA, temperatura, tratamiento farmacológico previo, puntuación NIHSS al ingreso y mRS al alta y subtipo etiológico del ictus), de laboratorio (leucocitos, fibrinógeno, glucemia y citoquinas) y polimorfismos en genes que codifican para moléculas inflamatorias.

La descripción de las variables cuantitativas se realizó mediante la media y desviación estándar. La descripción de las variables cualitativas se realizó mediante tablas de frecuencias.

Se obtuvo un análisis global de los valores de leucocitos, fibrinógeno y citoquinas en la muestra, y un análisis estratificado en función del sexo, de los factores de riesgo vascular, del tratamiento farmacológico previo, de las puntuaciones NIHSS y mRS y del subtipo de ictus.

Para evaluar la asociación con variables de tipo cualitativo se realizó una comparación mediante la prueba de Mann-Whitney, excepto en la comparación con el subtipo de ictus, en que se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, debido a la existencia de más de dos grupos.

Para evaluar la asociación con variables cuantitativas se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

Se realizó también un análisis descriptivo de polimorfismos de moléculas inflamatorias en los pacientes y en la población control. Para evaluar la asociación de cada polimorfismo en la población total y por subgrupos en función de las puntuaciones NIHSS y mRS, se obtuvieron las OR y sus respectivos intervalos de confianza al 95%, mediante modelos de regresión logística ajustados por sexo y edad.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron empleando pruebas bilaterales y tomando un nivel de significación del 5%. Para el cálculo de intervalos de confianza se tomó un nivel de confianza del 95%. Las pruebas que resultaron en un valor de p inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS. DISTRIBUCIÓN DE FACTORES DE RIESGO VASCULAR Y OTRAS VARIABLES CLÍNICAS

Se incluyeron en el estudio un total de 92 pacientes, con una media de edad de 78,6 años ($\pm 13,1$), de los cuales 34 eran varones (37%) y 58 mujeres (63%).

Dentro de los factores de riesgo vascular, el más frecuente fue la HTA, que estaba presente en un 77% de los pacientes ($n=71$), mientras que otros factores de riesgo vascular fueron menos frecuentes: 27,2% ($n=25$) tenían DM, DL 45,7% ($n=42$) y tabaquismo 21,7% ($n=20$). Tenían antecedentes de isquemia cerebral previa, establecida o transitoria, 27 pacientes (29,3%).

Al analizar la distribución de los factores de riesgo vascular por sexos en los pacientes con ictus se observó que estos se distribuían de igual forma en ambos grupos, a excepción del tabaquismo que fue más frecuente en hombres. Sólo el 13,8% de las mujeres tenían antecedentes de tabaquismo, que estaba presente en el 35,3% de los hombres ($p 0,03$). El 81% de las mujeres eran hipertensas ($n=47$) y el 70,6% ($n=24$) de los varones lo eran ($p 0,37$). La DM estaba presente en el 29,3% de las mujeres y en el 25,3% de los varones ($p 0,72$). El 43,1% de las mujeres y el 50% de los varones tenían dislipemia ($p 0,67$).

Se compararon los factores de riesgo vascular en este grupo con los de una población control de 262 personas sin antecedentes trombóticos ni tratamiento anticoagulante, constituida por 127 mujeres (48,5%) y 135 varones (51,5%), con una media de edad similar a la del grupo de pacientes ($75,8 \pm 12,5$ años; $p 0,09$). En esta población el factor de riesgo vascular más frecuente fue también la HTA, presente en el 42,6% de la muestra ($n=95$), seguida de DL (25,6%, $n=57$), tabaquismo (14,9%, $n=33$) y DM (12,1%, $n=27$) (figura 1).

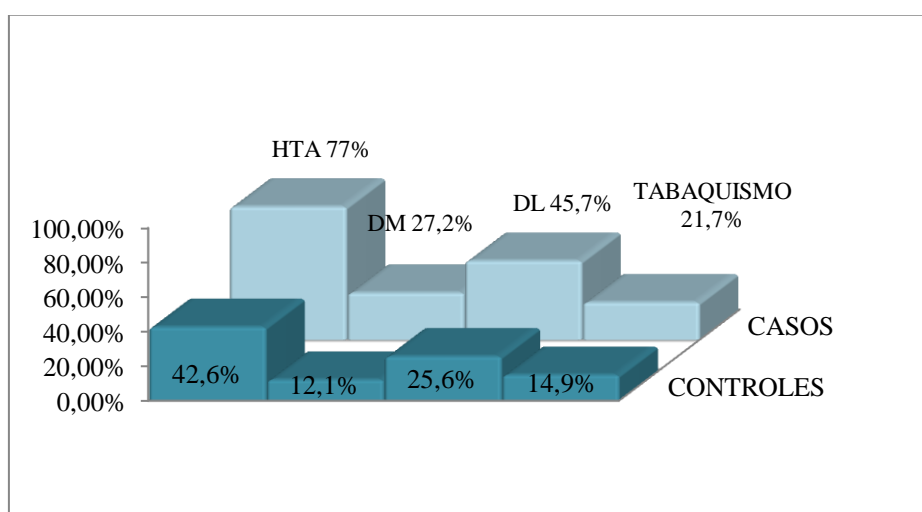


Figura 1. Distribución de factores de riesgo vascular en pacientes y controles

Se analizaron las OR para cada factor de riesgo en ambas poblaciones, ajustadas por sexo y edad (± 5 años). De tal modo, para la HTA la OR fue de 2,5 (IC 95% 1,4-4,7; p 0,0027), para la DM la OR fue de 1,7 (IC 95% 0,8-3,2; p 0,1354), para la DL OR 2,2 (IC 95% 1,3-3,9; p 0,0053) y para el tabaquismo OR 6,3 (IC 95% 2,8-15,2; p <0,0001) (tabla 12).

Tabla 12. Odds ratio para cada factor de riesgo vascular en casos y controles

VARIABLE	OR	IC 95%	p
HTA	2,5	1,4-4,7	0,003
DM	1,7	0,8-3,2	0,135
DL	2,2	1,3-3,9	0,005
Tabaquismo	6,3	2,8-15,2	<0,0001

En el grupo de pacientes la tensión arterial sistólica al ingreso fue de 157,6 mmHg ($\pm 23,9$) y la diastólica de 81,3 mmHg ($\pm 18,2$). La temperatura media al ingreso fue de 36,2°C ($\pm 0,5$).

El 30,8% de los pacientes estudiados (n=28) tenía antecedentes de FA paroxística o crónica.

Respecto al tratamiento previo destaca que más de la mitad de los pacientes estudiados, el 60,9% (n=56), estaba en tratamiento antitrombótico (antiagregante o anticoagulante), sin diferencia entre sexos. Se constató que el 63,8% de las mujeres y el 55,9% de los hombres tomaban antitrombóticos (p 0,59). La indicación del tratamiento antiagregante fue por prevención secundaria tras patología vascular cerebral en 14 pacientes, por prevención secundaria por cardiopatía isquémica en 8 pacientes o por ambas razones en 1 paciente. El uso de anticoagulantes (antagonistas de la vitamina K) se indicó como profilaxis de los eventos tromboembólicos en pacientes con fibrilación auricular.

El 41,3% (n=38) de los pacientes estaba en tratamiento con estatinas en el momento de padecer el infarto cerebral, sin diferencias entre sexos, de forma que el 41,4% de las mujeres y el 41,2% de los hombres estaba en tratamiento con este grupo de fármacos (p 0,98).

2. CARACTERÍSTICAS DEL INFARTO CEREBRAL

La mayor parte de los pacientes incluidos en este estudio presentaron infartos cerebrales graves, siendo la puntuación media de NIHSS al ingreso de 12,3 (0-38). El 64,1% de ellos (n=59) presentó puntuaciones de NIHSS al ingreso ≥ 6 .

También se observó que la mayor parte de los pacientes tuvo una mala situación funcional al alta. Así, el 63% de los pacientes (n=58) mantuvo al alta una situación de dependencia funcional, con valores en la escala mRS >2 , siendo la puntuación media de 3,4 (0-6).

Siguiendo la clasificación etiológica TOAST, la distribución de los diferentes tipos de ictus fue como sigue: causa aterotrombótica en 28 pacientes (30,4%), causa cardioembólica en 36 (39,1%), lacunar en 12 pacientes (13%), inhabitual en 4 (4,3%) y etiología indeterminada en 12 pacientes (13%), por estudio incompleto o por la existencia de dos o más mecanismos posibles (figura 2).

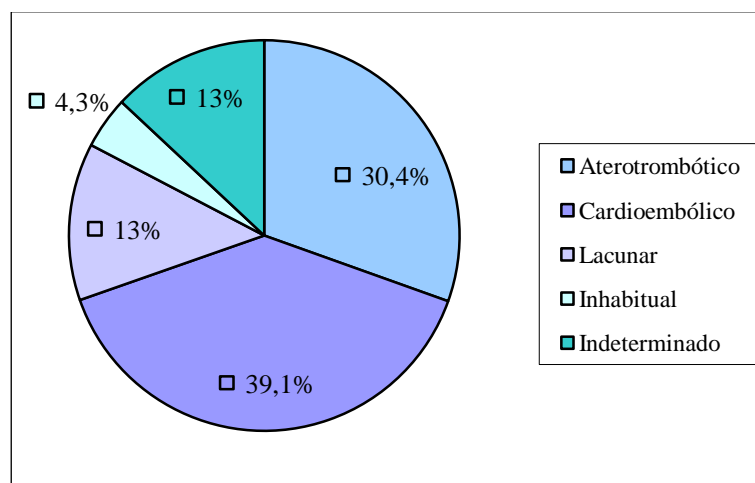


Figura 2. Distribución de los ictus según la etiología

En más de la mitad de los casos (68,5%, n=63) el TAC craneal realizado en el momento agudo no mostró signos precoces de infarto.

3. VARIABLES ANALÍTICAS

3.1. Parámetros hematológicos y bioquímicos

La cifra media de leucocitos fue de $9.700 \pm 3.344/\mu\text{l}$ y la de plaquetas de $226.640 \pm 8.376/\mu\text{l}$. El hematocrito fue de $41,3\% \pm 5,2$ y la concentración media de fibrinógeno de $427,1 \pm 122,5$ mg/dl.

La concentración media de colesterol total en la muestra analizada fue de $176,4 \pm 42,7$ mg/dl, siendo la concentración de LDL y de triglicéridos de $116,7 \pm 35,1$ mg/dl y de $114,0 \pm 56,0$ mg/dl, respectivamente. Las cifras medias de glucemia fueron de $137,7 \pm 60,4$ mg/dl.

3.1.1. Leucocitos: relación con otras variables

No se evidenció asociación de la cifra de leucocitos con la edad (coeficiente de correlación $-0,1$; p 0,40) ni con el sexo ($8.956,1 \pm 2.979/\mu\text{l}$ en varones vs $10.141 \pm 3.491/\mu\text{l}$, en mujeres; p 0,10). Tampoco se encontró asociación con los factores

de riesgo vascular estudiados: HTA ($9.613 \pm 3.160/\mu\text{l}$ en hipertensos vs $10.010 \pm 3.975/\mu\text{l}$ en no hipertensos; p 0,64), DM ($9.432 \pm 3.101/\mu\text{l}$ en diabéticos vs $9.805 \pm 3.448/\mu\text{l}$ en no diabéticos; p 0,64), DL ($9.372 \pm 3.171/\mu\text{l}$ en pacientes con DL frente a $9.793 \pm 3.703/\mu\text{l}$ en los no dislipémicos; p 0,56) ni tabaquismo ($9.980 \pm 2.757/\mu\text{l}$ en fumadores vs $9.627 \pm 3.503/\mu\text{l}$ en no fumadores; p 0,68).

No se detectaron diferencias en pacientes con o sin tratamiento antitrombótico previo ($9.361 \pm 3.070/\mu\text{l}$ frente a $10.240 \pm 3.713/\mu\text{l}$, respectivamente; p 0,22).

Tampoco se observaron diferencias significativas entre el número total de leucocitos en función de la gravedad del ictus al ingreso ($9.691 \pm 3.022/\mu\text{l}$ en pacientes con NIHSS <6 y $9.712 \pm 3.582/\mu\text{l}$ en pacientes con NIHSS ≥ 6 ; p 0,96), ni con la situación funcional de los pacientes al alta ($9.500 \pm 3.053/\mu\text{l}$ en pacientes con mRS ≤ 2 y $9.823 \pm 3.524/\mu\text{l}$ en pacientes con mRS >2; p 0,66).

No se encontró diferencia en la concentración de leucocitos en función del subtipo etiológico de la isquemia cerebral.

3.1.2. Fibrinógeno: relación con otras variables

Se detectaron concentraciones de fibrinógeno significativamente menores en los varones respecto a las mujeres ($387,6 \pm 112,4$ mg/dl vs $450,4 \pm 123,9$ mg/dl, respectivamente; p 0,02) (figura 3).

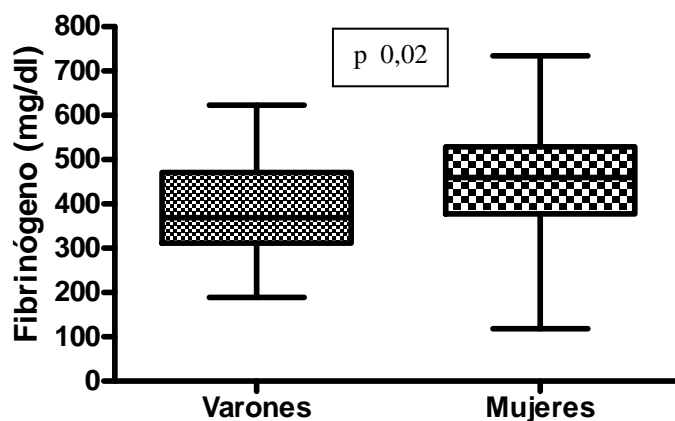


Figura 3. Distribución de la concentración de fibrinógeno según el sexo

No se encontraron diferencias significativas en función de la edad (coeficiente de correlación 0,1; p 0,26), ni de los factores de riesgo vascular clásicos: HTA (418,1±121,1 mg/dl en hipertensos vs 457,4±125,4 mg/dl en no hipertensos; p 0,20), DM (443,6±134,2 mg/dl en diabéticos vs 421±118,3 mg/dl en no diabéticos; p 0,43), DL (434±114,1 mg/dl en pacientes con DL frente a 415,9 ±126,5 mg/dl en los no DL; p 0,47) ni tabaquismo (433,3±119,4 mg/dl en fumadores vs 425,4±124,1 mg/dl en no fumadores; p 0,80).

Al analizar la concentración de fibrinógeno en función del tratamiento previo con antiagregantes o anticoagulantes tampoco se evidenciaron diferencias. De este modo, en pacientes con tratamiento antitrombótico las concentraciones de fibrinógeno fueron de 441,8±110,8 mg/dl frente a 404,3±137,2 mg/dl en pacientes sin dicho tratamiento (p 0,15).

Se estudió la relación de las concentraciones de fibrinógeno con la gravedad del infarto y se determinó que los niveles de fibrinógeno fueron ligeramente superiores en pacientes con infartos más graves, sin que los datos resultasen estadísticamente significativos (410,7±125,9 mg/dl en pacientes con NIHSS<6 y 431,7±118,1 mg/dl en pacientes con NIHSS≥6; p 0,43) (figura 4).

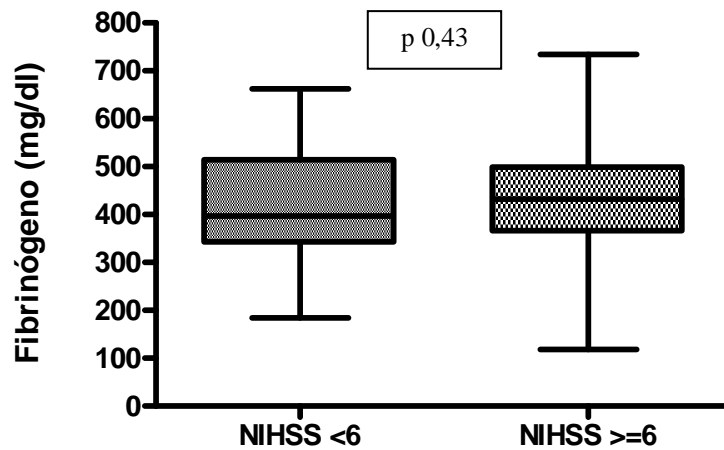


Figura 4. Relación de la concentración de fibrinógeno con la puntuación NIHSS al ingreso

También se detectó una tendencia a concentraciones mayores de fibrinógeno en pacientes que al alta quedaron con dependencia funcional, sin que los resultados alcanzasen significación estadística ($400,1 \pm 125$ mg/dl en pacientes con $mRS \leq 2$ vs $442,9 \pm 119,2$ mg/dl en pacientes con $mRS > 2$; $p 0,10$) (figura 5).

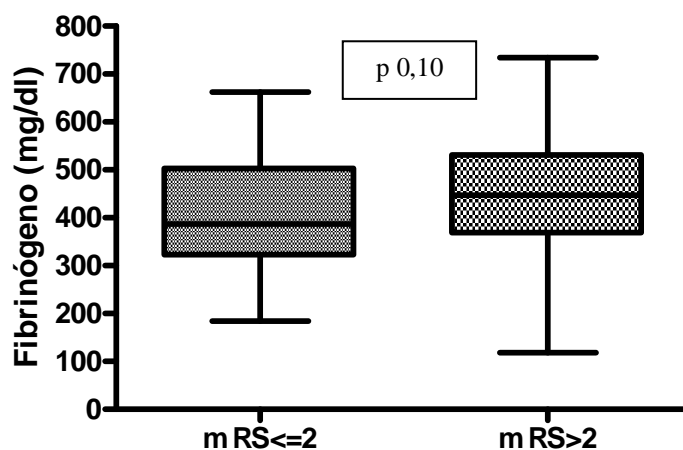


Figura 5. Relación del fibrinógeno con la puntuación en la escala de Rankin modificada, al alta

Al analizar los datos considerando la puntuación de la escala de Rankin como una variable continua, se observó que sí existía una correlación estadísticamente significativa entre la cantidad de fibrinógeno y los valores de mRS, de forma que pacientes con concentraciones más altas de fibrinógeno tenían puntuaciones mayores en la escala mRS (coeficiente de correlación 0,2; $p < 0,03$) (figura 6).

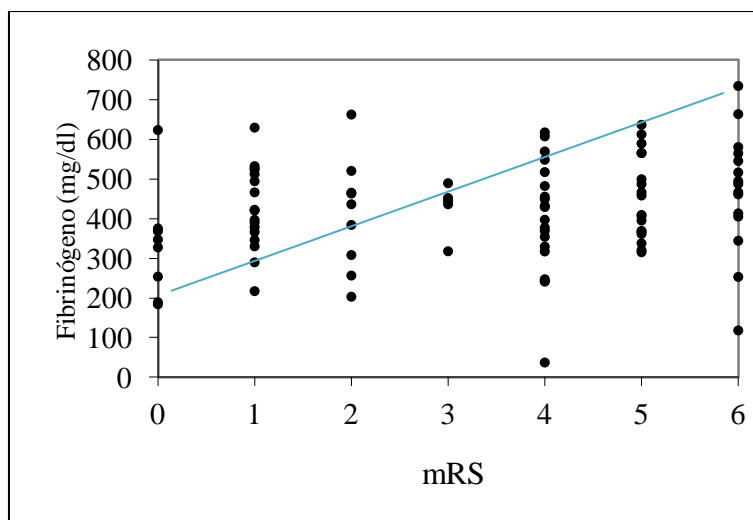


Figura 6. Relación de la concentración de fibrinógeno y la puntuación en la escala de Rankin modificada, al alta, considerada como variable continua

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de fibrinógeno en función de los subtipos etiológicos del infarto.

3.2. Estudio de citoquinas

En un subgrupo de 23 pacientes se pudo obtener suero en las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas y almacenarlo a -80°C para llevar a cabo las determinaciones de citoquinas.

3.2.1. IL-6: relación con otras variables

La concentración media de IL-6 (n=22) fue de $3,6 \pm 0,9$ pg/ml. No se detectaron diferencias significativas entre varones y mujeres ($4,0 \pm 1,2$ vs $3,8 \pm 0,5$ pg/ml respectivamente; p 0,36), ni relación con la edad (coeficiente de correlación 0,1; p 0,06). Tampoco se encontraron valores distintos en función de la presencia o ausencia de HTA, de DM o de tabaquismo. Así, en pacientes hipertensos la concentración media de IL-6 fue de $3,9 \pm 0,9$ pg/ml y en no hipertensos de $3,9 \pm 0,6$ pg/ml (p 0,89). En pacientes diabéticos de $4,3 \pm 1,7$ pg/ml frente a $3,8 \pm 0,5$ pg/ml en los no diabéticos (p 0,75), y de $3,8 \pm 0,5$ pg/ml en fumadores y $3,9 \pm 0,9$ pg/ml en no fumadores (p n.s).

Sí se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-6 en pacientes con antecedentes de DL frente a los no dislipémicos, de forma que estos fueron mayores en los pacientes sin este factor de riesgo vascular ($3,4 \pm 0,3$ vs $4,1 \pm 0,9$ pg/ml; p 0,02) (figura 7).

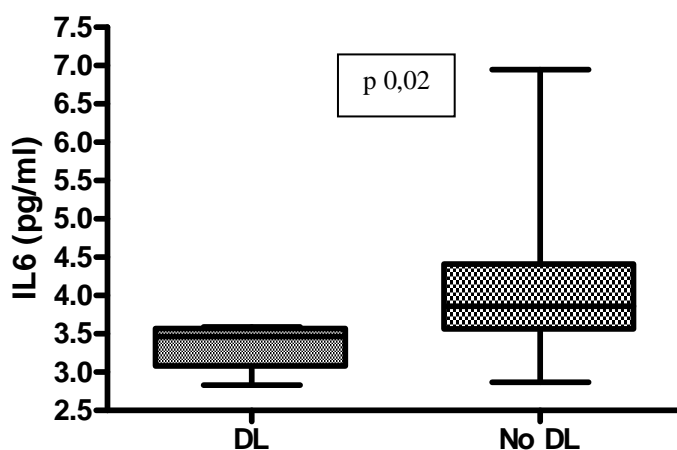


Figura 7. Relación de los niveles de IL-6 con el antecedente de dislipemia

No se observaron diferencias en los niveles de IL-6 en función del uso previo de antitrombóticos ($3,6 \pm 0,6$ vs $4,1 \pm 1,0$ pg/ml; p 0,12).

Al comparar la concentración de IL-6 en función de la gravedad inicial del infarto, se determinó que los pacientes con puntuaciones de NIHSS ≥ 6 tenían valores mayores de IL-6 ($4,2 \pm 1,0$ pg/ml) que aquellos con NIHSS < 6 ($3,5 \pm 0,4$ pg/ml; $p 0,02$) (figura 8).

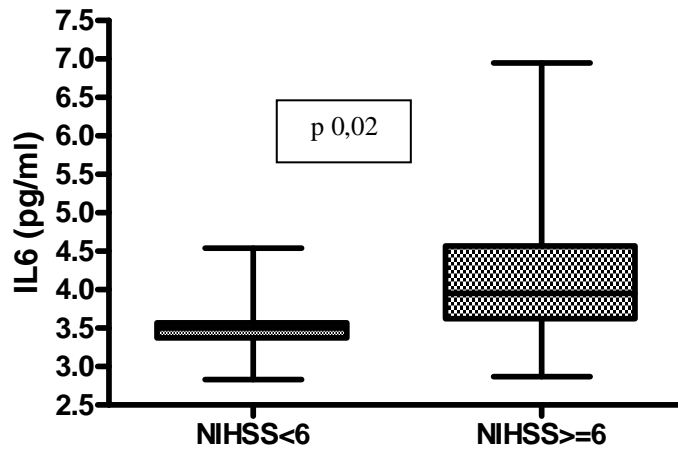


Figura 8. Relación de los niveles de IL-6 con la puntuación NIHSS al ingreso

Respecto a la situación funcional, los pacientes con una situación de independencia funcional presentaron concentraciones más bajas de IL-6 en las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas que aquellos que quedaban funcionalmente dependientes ($3,4 \pm 0,5$ vs $4,2 \pm 0,9$ pg/ml; $p 0,01$) (figura 9).

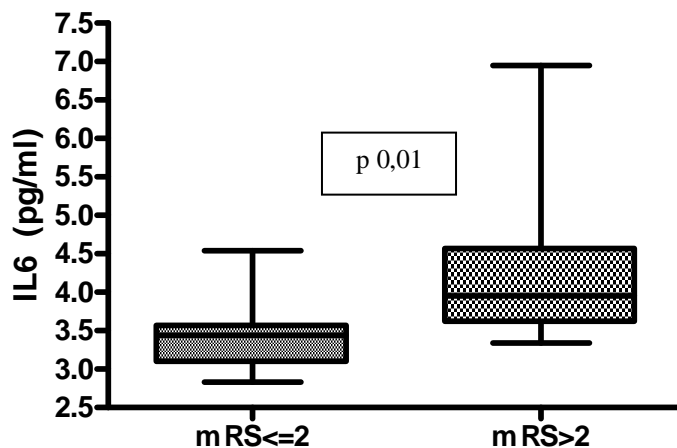


Figura 9. Relación de los niveles de IL-6 con la escala de Rankin modificada al alta

No se encontraron diferencias en los niveles de IL-6 en las primeras 24 horas en función de los distintos subtipos etiológicos de ictus.

3.2.2. *IL-1 α e IL-1 β : relación con otras variables*

La concentración media de IL-1 α en las primeras 24 horas del infarto cerebral en los pacientes analizados (n=22) fue de 2,8 \pm 0,9 pg/ml sin diferencias entre sexos (varones 2,9 \pm 1,1 pg/ml, mujeres 2,8 \pm 0,8 pg/ml; p n.s), ni con los factores de riesgo vascular: pacientes con y sin antecedentes de HTA (2,9 \pm 0,9 vs 2,7 \pm 0,9 pg/ml; p 0,89), con o sin DM (2,9 \pm 0,8 vs 2,8 \pm 0,9 pg/ml, p 0,69), con o sin DL (2,9 \pm 0,8 vs 2,8 \pm 0,9 pg/ml; p 0,57) y con o sin hábito tabáquico (2,5 \pm 0,7 vs 2,9 \pm 0,7 pg/ml; p 0,39).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas de los valores de IL-1 α entre pacientes con tratamiento antitrombótico previo y aquellos que no lo tomaban (2,9 \pm 1,1 vs 2,8 \pm 0,8 pg/ml; p 0,97).

Al analizar las concentraciones de IL-1 α en función de la gravedad del ictus al ingreso no se encontraron diferencias entre los grupos (2,5 \pm 0,8 pg/ml en pacientes con NIHSS <6 y 3,1 \pm 0,9 pg/ml en pacientes con NIHSS \geq 6; p 0,20), así como tampoco en función del pronóstico funcional al alta. De tal forma, las concentraciones de IL-1 α fueron de 2,8 \pm 1,2 pg/ml en los pacientes independientes al alta y de 2,9 \pm 0,7 pg/ml en aquellos con mRS >2 (p 0,49).

Resultados similares se obtuvieron para las concentraciones de IL-1 β (n=20), que presentó una concentración media de 3,3 \pm 2,6 pg/dl. Los valores fueron semejantes en varones y en mujeres (3,5 \pm 2,3 pg/ml en varones y 5,0 \pm 2,8 pg/ml en mujeres; p 0,15), en pacientes hipertensos (3,8 \pm 2,3 pg/ml) y en no hipertensos (5,5 \pm 3,4 pg/ml; p 0,42), en diabéticos frente a no diabéticos (3,7 \pm 3,5 vs 4,3 \pm 2,3 pg/ml; p 0,48), en pacientes con o sin DL (3,3 \pm 3,2 vs 4,6 \pm 2,3 pg/ml; p 0,13) y en fumadores y no fumadores (3,4 \pm 2,9 vs 4,5 \pm 2,4 pg/ml; p 0,34).

Lo mismo ocurrió al analizar las concentraciones de IL-1 β en función del tratamiento previo, que resultaron similares en pacientes con y sin tratamiento antitrombótico (3,9 \pm 1,7 y 4,4 \pm 3,2 pg/ml respectivamente; p 0,88).

También fueron semejantes los valores de IL-1 β en pacientes con NIHSS <6 y \geq 6 al ingreso (4,9 \pm 3,4 vs 3,8 \pm 2,0 pg/ml; p 0,75). Asimismo, en pacientes con peor pronóstico funcional al alta las concentraciones de IL-1 β fueron similares a las de los pacientes con independencia funcional (4,2 \pm 3,5 vs 4,2 \pm 1,9 pg/ml; p 0,37).

No existen diferencias de concentraciones de IL-1 α ni de IL-1 β en función del subtipo de ictus.

3.2.3. TNF- α : relación con otras variables

La concentración media de TNF- α en los pacientes estudiados (n=20) fue de 2,5 \pm 1,1 pg/ml. No se observaron diferencias significativas en función del sexo (2,7 \pm 1,1 en varones y 2,5 \pm 1,2 en mujeres; p 0,70), así como tampoco en función de los factores de riesgo vascular: 2,5 \pm 1,2 pg/ml en hipertensos frente a 2,7 \pm 0,6 pg/ml en no hipertensos (p 0,79); 1,6 \pm 0,6 pg/ml en diabéticos frente a 2,8 \pm 1,1 pg/ml en no diabéticos (p 0,08); 1,7 \pm 0,5 pg/ml en pacientes con antecedentes de DL frente a 2,9 \pm 1,1 pg/ml en los no dislipémicos (p 0,05). En pacientes fumadores los niveles de TNF- α fueron discretamente menores que en no fumadores 1,4 \pm 1,9 pg/ml vs 3,1 \pm 2,9 pg/ml, respectivamente (p 0,04).

Asimismo las concentraciones de TNF- α en las primeras 24 horas del infarto cerebral fueron similares, independientemente de que los pacientes estuvieran con o sin tratamiento antitrombótico. Así, en pacientes con antitrombóticos las concentraciones medias de TNF- α fueron de 2,2 \pm 1,2 pg/ml y en pacientes sin dicho tratamiento de 2,8 \pm 0,9 pg/ml (p 0,19).

Al analizar las concentraciones de este marcador teniendo en cuenta la gravedad del infarto y el pronóstico funcional al alta, se demostró que los pacientes con infartos

más severos y en aquellos con peor pronóstico funcional tenían una tendencia a presentar concentraciones más altas, aunque los datos no resultaron estadísticamente significativos. En los pacientes con NIHSS<6 las concentraciones medias fueron de $2,4\pm 0,8$ pg/ml mientras que en los pacientes con NIHSS ≥ 6 fueron de $2,7\pm 1,3$ pg/ml (p 0,49). En los pacientes funcionalmente dependientes al alta (mRS>2) las concentraciones de TNF- α fueron de $2,8\pm 1,2$ pg/ml, y en los pacientes con mRS ≤ 2 de $2,2\pm 0,9$ pg/ml (p 0,25).

4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA TOMA PREVIA DE ESTATINAS CON OTROS PARÁMETROS

De los pacientes estudiados destaca que el 41,3% (n=38) estaba en tratamiento con estatinas en el momento de padecer el infarto cerebral.

Al analizar la gravedad del infarto en función del tratamiento previo con este grupo de fármacos no se encontraron diferencias entre pacientes con dicho tratamiento (NIHSS media de $11,5\pm 9,6$) y pacientes sin estatinas (NIHSS $12,8\pm 10,8$) (p 0,69). Tampoco evidenciamos diferencias en la situación funcional al alta, de forma que en los pacientes que tomaban estatinas previas al infarto cerebral la puntuación media en la escala mRS fue de $3,4\pm 2,1$ y en los pacientes sin estatinas fue de $3,3\pm 1,9$ (p 0,75).

No se observaron diferencias en las cifras de leucocitos, $9.192\pm 3.283/\mu\text{l}$ vs $9.930\pm 3.589/\mu\text{l}$ (p 0,32), ni en los niveles de fibrinógeno ($444,6 \pm 143,3$ mg/dl vs $425,9\pm 130$ mg/dl; p 0,52), en pacientes con estatinas frente a pacientes que no las tomaban.

Se observaron valores menores de IL-6 y de TNF- α en aquellos pacientes que estaban en tratamiento con estatinas antes del infarto, respecto a aquellos que no las tomaban. Las concentraciones de IL-6 en pacientes fueron las siguientes: $3,2\pm 0,3$ vs $4,1\pm 0,9$ pg/ml; p 0,008 (figura 10) y las concentraciones de TNF- α : $1,5\pm 0,5$ pg/ml frente a $2,9\pm 1,0$ pg/ml; p 0,01 (figura 11).

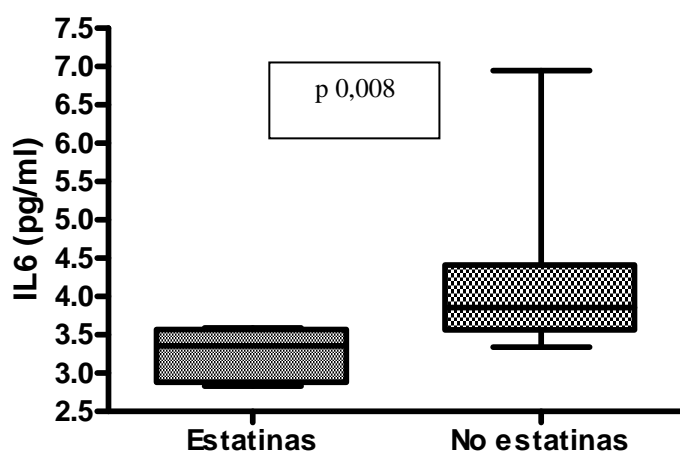


Figura 10. Concentración de IL-6 en relación con el uso de estatinas previo al ictus

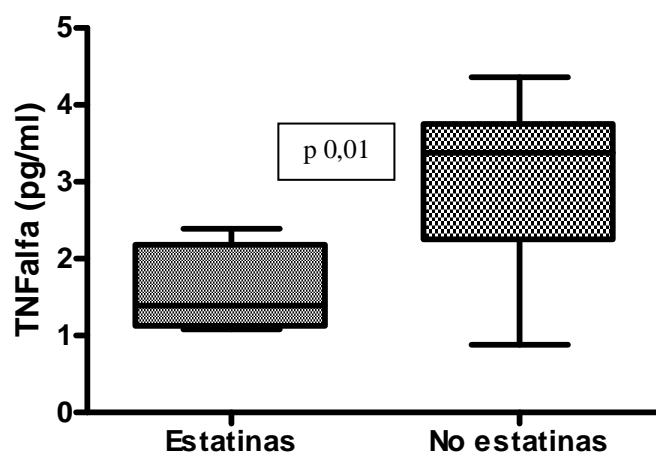


Figura 11. Concentración de TNF α en relación con el consumo de estatinas previo al ictus

No se detectaron diferencias entre los grupos que tomaban y no tomaban estatinas en cuanto a las cifras de IL-1 α (3,2 \pm 1,3 vs 2,7 \pm 0,7 pg/ml; p 0,53) e IL-1 β (3,9 \pm 3,3 vs 4,3 \pm 2,4 pg/ml; p 0,54).

5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN GENES DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS

En un subgrupo de 23 pacientes se estudiaron polimorfismos en genes de moléculas proinflamatorias y se compararon con un grupo control (n=54), de población sin antecedentes tromboembólicos, apareado por sexo y edad (\pm 5 años) con los pacientes.

Los polimorfismos analizados fueron los siguientes: polimorfismo -174 GC en el gen de la IL-6, polimorfismo -889 CT en el gen de la IL-1 α , polimorfismos -511 CT y +3954 CT en el gen de la IL-1 β y polimorfismo -238 GA en el gen del TNF- α .

5.1. Distribución de polimorfismos

5.1.1. Polimorfismo -174 GC en el gen de la IL-6

Se observaron diferencias significativas en la distribución de los distintos polimorfismos entre el grupo de pacientes y el grupo control, de forma que el alelo C (genotipos GC y CC) fue más frecuente en el grupo de pacientes. En el grupo de pacientes el genotipo GG estaba presente en el 33,3% y los genotipos GC+CC en el 66,7%. En el grupo control la frecuencia del genotipo GG fue de 63% y la de los genotipos GC+CC de 37% (p 0,04) (figura 12).

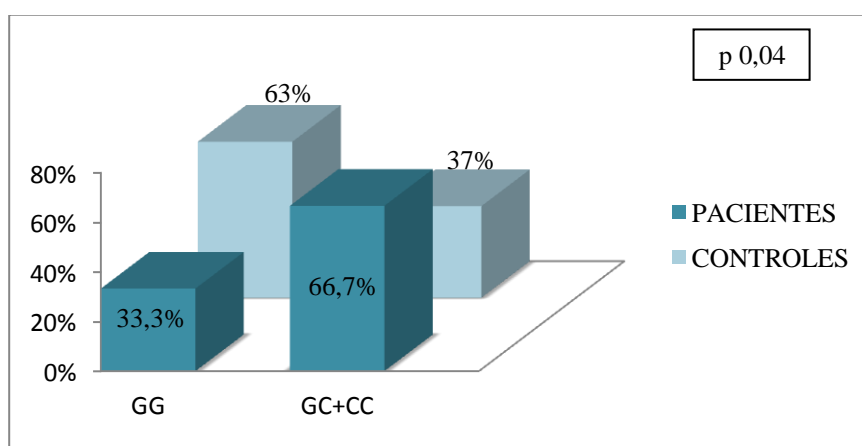


Figura 12. Distribución del polimorfismo -174 GC del gen de la IL-6 en casos y controles

Al analizar las OR correspondientes a los genotipos GC+CC en casos respecto a los controles apareados por sexo y edad, se determinó que los genotipos GC+CC conferían una OR de 3,5 (IC 95% 1,2-10,9; p 0,02) para el desarrollo de ictus.

Al analizar las OR correspondientes a los polimorfismos GC+CC por subgrupos de gravedad de infarto y de situación funcional, se evidenció que los genotipos GC+CC conferían una OR de 7,3 (IC 95% 1,5-56,7; p 0,03) en el subgrupo de pacientes con NIHSS<6. También se encontró relación de dichos genotipos en los pacientes con peor situación funcional al alta: OR 3,9 (IC 95% 1,0-16,5; p 0,05) (tabla 13).

Tabla 13. Odds Ratio de los genotipos GC+CC del polimorfismo -174GC del gen de la IL-6 en función de la gravedad y la situación funcional de los pacientes

SUBGRUPO	OR	IC 95%	p
NIHSS<6	7,3	1,5-56,7	0,03
NIHSS≥6	2,5	0,7-9,6	0,17
mRS ≤2	3,4	0,8-17,9	0,11
mRS>2	3,9	1,0-16,8	0,05

5.1.2. Polimorfismo -889 CT en el gen de la IL-1 α

No se detectaron diferencias en la distribución de genotipos entre la población control y los pacientes. De este modo el genotipo CC en la población control representaba el 47,2% y en la población de pacientes el 41,2%, mientras que los genotipos CT+TT constituían el 52,8% de la población control y el 58,8% de la población de pacientes (p 0,78) (figura 13).

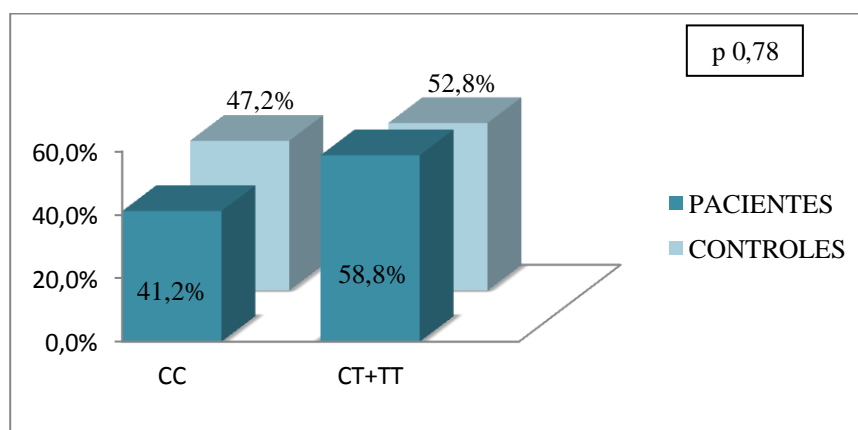


Figura 13. Distribución del polimorfismo -889CT del gen IL-1 α en casos y controles

No se encontró incremento de OR para los genotipos CT+TT al analizar por subgrupos de gravedad del infarto ni de situación funcional al alta.

5.1.3. Polimorfismos -511 CT y +3954 CT en el gen de la IL-1 β

En este estudio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución de estos polimorfismos entre casos y controles en el análisis total de la población, así como tampoco en el análisis por subgrupos de ictus.

Respecto al polimorfismo -511 CT los porcentajes de cada uno de los genotipos en casos y controles fueron los que siguen: genotipo CC 52,6% en casos y 43,4% en controles, genotipos CT+TT 47,4% en casos y 56,6% en controles, p 0,59 (figura 14).

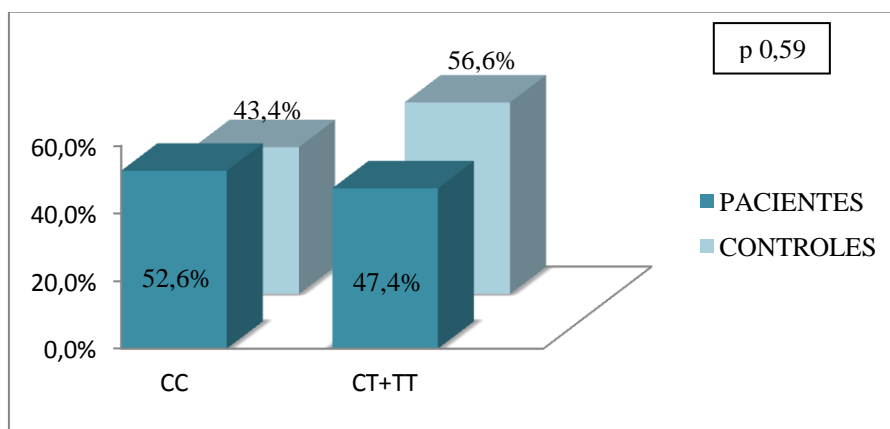


Figura 14. Distribución del polimorfismo -511CT del gen *IL-1β* en casos y controles

En el estudio del polimorfismo +3954 CT la distribución de genotipos fue la siguiente: en la población control 50% CC y 50% CT+TT. En el grupo de pacientes los porcentajes fueron 52,9% CC y 47,1% CT+TT (p n.s) (figura 15).

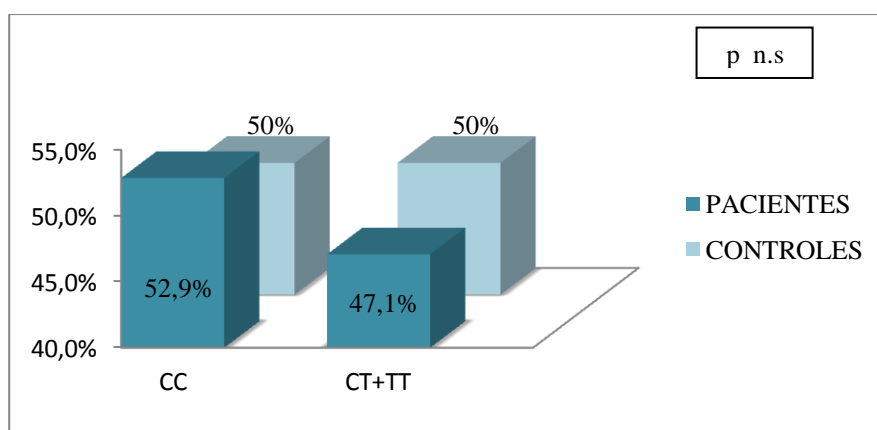


Figura 15. Distribución del polimorfismo +3954C/T del gen *IL-1β* en casos y controles

Tampoco se evidenció incremento de OR al analizar por subgrupos en función de la gravedad del infarto ni de la situación funcional al alta.

5.1.4. Polimorfismo -238 GA en el gen del TNF- α .

Respecto al polimorfismo -238 GA del TNF- α el genotipo más frecuente, tanto en casos como en controles fue el GG (84,2% en casos y 90,7% en controles), siendo los porcentajes de los genotipos GA+AA 15,8% en casos y 9,3% en controles (p 0,66) (figura 16).

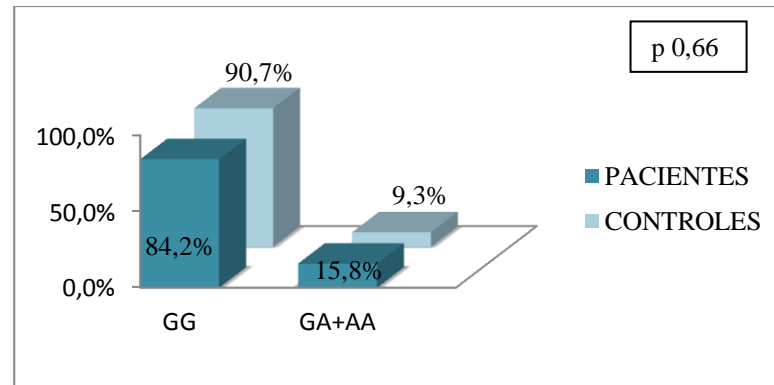


Figura 16. Distribución del polimorfismo -238 GA en el gen del TNF- α en casos y controles

No se pudieron estimar las OR por el escaso número de pacientes con genotipo AA.

DISCUSIÓN

La enfermedad cerebrovascular o ictus es un problema de la circulación cerebral en el cual un área del encéfalo se afecta por una isquemia o hemorragia, con una proporción en torno al 85 y 15%, respectivamente. Existen diversas clasificaciones de la enfermedad cerebrovascular, en función del subtipo de ictus, el perfil evolutivo, los resultados de la neuroimagen, la etiología, el tamaño, la topografía de la lesión o el mecanismo de producción.

Esta patología tiene una elevada prevalencia, con importantes consecuencias en cuanto a la morbimortalidad de los pacientes que la padecen [1]. En Europa se ha estimado una prevalencia del 4,8% en personas de entre 65 y 84 años [3]. Además, se sabe que aproximadamente un 30% de los pacientes que sobreviven requiere algún tipo de ayuda para las actividades de la vida diaria y cerca de un 20% necesita ser institucionalizado [6].

Como se ha descrito previamente, son numerosos los factores de riesgo de la enfermedad cerebrovascular, dentro de los que cabe destacar algunos no modificables, tales como la edad y el sexo, y otros modificables como la HTA, DM, DL o el tabaquismo, entre otros. Además existen una serie de factores parcialmente modificables, como la inflamación y la infección, que están íntimamente relacionados con la isquemia cerebral, ya que entre otras razones se relacionan con los factores de riesgo clásico que hemos mencionado [44].

Es sabido que la aterosclerosis es uno de los principales factores implicados en la patogenia de la enfermedad vascular cerebral. Teniendo en cuenta la base fisiopatológica de la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria [44, 54, 55], cabe pensar que los marcadores plasmáticos de inflamación pueden estar relacionados con la gravedad de la isquemia cerebral y con el pronóstico funcional de los pacientes que sufren esta enfermedad. Conocer qué factores están más relacionados con el pronóstico clínico permitiría aplicar medidas terapéuticas más agresivas en aquellos pacientes que, presumiblemente, tendrán infartos cerebrales más graves y/o un peor pronóstico funcional.

También hay evidencia de que ciertos fármacos, como las estatinas, tienen un efecto antiinflamatorio, más allá de su papel como reductores de los niveles de colesterol [181,191], lo que permitiría utilizarlos para disminuir el estado inflamatorio de los pacientes con isquemia cerebral y de este modo mejorar su situación clínica.

En este trabajo de investigación se incluyó una población de 92 pacientes con infarto cerebral de menos de 24 horas de evolución y una población control, constituida por 262 personas sin antecedentes de enfermedad tromboembólica, que se emparejaron por sexo y edad (± 5 años) con el grupo de pacientes. Para la selección de ambos grupos se excluyeron aquellas personas con antecedentes de enfermedad autoinmune, tumoral y de infección en la semana previa a la recogida de las muestras.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar esta población de pacientes con infarto cerebral agudo en cuanto a sus variables demográficas, factores de riesgo vascular y características del infarto. Además se han evaluado las concentraciones de marcadores inflamatorios y se ha estudiado su relación con la gravedad del infarto y el pronóstico funcional. Asimismo se ha analizado la distribución de polimorfismos de los genes que codifican para moléculas proinflamatorias, se ha evaluado la relación entre los diferentes polimorfismos, la gravedad del infarto y el pronóstico funcional de los pacientes con ictus, y se ha estudiado si el tratamiento previo con estatinas modifica el perfil inflamatorio de estas personas y si esto tiene relación con la presentación clínica y con su evolución.

La gravedad del infarto se determinó mediante la escala NIHSS al ingreso, que es una escala validada en español y ampliamente utilizada para evaluar la gravedad clínica de los pacientes con infarto cerebral. Además se correlaciona bien con el volumen del infarto y la situación funcional [216]. Su principal limitación es que las puntuaciones son mayores en los infartos de hemisferio dominante y que la isquemia vertebrobasilar se asocia con puntuaciones menores a pesar de que son infartos graves y con elevada morbimortalidad. Consideramos, de acuerdo con la literatura [217], que los pacientes con puntuaciones menores de 6 tenían infartos leves y aquellos con puntuaciones de 6 o superiores, infartos moderados o graves. Sin embargo, esta

clasificación podría ser discutida, ya que otros trabajos consideran infartos leves aquellos con puntuaciones por debajo de 4, u otros.

La situación funcional al alta se determinó mediante la escala de Rankin modificada, al alta. Esta escala también mantiene una moderada correlación con el volumen del infarto [224] y se correlaciona de forma estrecha con la puntuación en otros índices de discapacidad [225,226]. También en esta escala, y de acuerdo con la descripción de las puntuaciones, hemos considerado un punto de corte para diferenciar a aquellos pacientes funcionalmente dependientes (≤ 2) de aquellos con independencia funcional (>2). Hemos de destacar que los datos de la escala mRS son los referidos al momento del alta hospitalaria. Sería interesante en futuros trabajos analizar la situación funcional a medio y largo plazo.

Características de la población estudiada.

La población control y la población de pacientes tuvieron unas características similares en cuanto a sexo y edad. Es de destacar que ambas tenían una edad media elevada (78,6 años en el grupo de pacientes y 75,8 años en los controles; p 0,09) y que los pacientes presentaron infartos graves, como se demuestra en el hecho de que la puntuación NIHSS media fuera de 12,3 (0-38), y que más de la mitad de ellos (64,1%) tuvieran puntuaciones de NIHSS al ingreso ≥ 6 . Asimismo los pacientes quedaron con importante afectación funcional al alta, presentando el 63% puntuaciones >2 en la escala de Rankin, con una puntuación media de 3,4 (0-6).

Encontramos diferencias significativas en la distribución de todos los factores de riesgo vascular entre pacientes y controles, a excepción de la DM, que si bien estaba presente con mayor frecuencia en los pacientes, las diferencias no fueron significativas (27,2% en pacientes y 12,1% en controles; OR 1,7 -IC 95% 0,8-3,2; p 0,135). El resto de factores de riesgo vascular analizados fueron, como cabía esperar, más frecuentes en el grupo de pacientes. Dentro de ellos el más prevalente fue la HTA, tanto en pacientes como en controles, que estaba presente en un 77% de los pacientes ($n=71$) y en un 42,6% de los controles ($n=95$), seguida de DL (45,7% en pacientes y 25,6% en controles), DM y tabaquismo (21,7% en pacientes y 14,9% en controles).

En nuestro grupo de pacientes destaca la elevada frecuencia de HTA, que es hasta un 25% más frecuente que en otras series españolas de pacientes con isquemia cerebral [231,232]. La DM y la DL también presentaron una frecuencia alta, del 27,2% y 45,7% respectivamente, mientras que en otros grupos de población española con isquemia cerebral están en torno al 16% [232] y 33%, respectivamente [233]. Sin embargo, hay que destacar de forma positiva que el porcentaje de tabaquismo está por debajo de la media de la población europea y por debajo de otros grupos de pacientes con infarto cerebral, que lo sitúan entre el 24,5% y 27% [231,232].

La prevalencia de los factores de riesgo en el grupo control no difiere de la descrita para población española o europea para cada uno de los factores de riesgo analizados, excepto para el tabaquismo que presenta una baja frecuencia en el grupo de nuestro estudio. Así, la prevalencia de HTA en Europa se estima en un 44% y en nuestro grupo control fue del 42,6% [234]. La DM tiene una prevalencia del 12% en población española mayor de 18 años [235], y en nuestro grupo fue del 12,1%. Asimismo se ha estimado una prevalencia de la DL del 24,3% [236] y en nuestro grupo control fue del 25,6%, mientras que la prevalencia media del tabaquismo en los años 90 en Europa es del 33,4% [237] y en nuestro grupo control fue menos de la mitad (14,9%).

También hay que reseñar que el 30,8% de los pacientes estudiados tenía antecedentes de FA paroxística o crónica, lo que es muy superior a los datos de prevalencia general, que estima la prevalencia en el 1%, variando entre el 0,1% en los menores de 55 años y el 9% en los mayores de 80 años [238], y discretamente superior a las de otras series de prevalencia de FA en pacientes con ictus, que la sitúan entre el 19,4% y el 24,6%. La prevalencia alta de FA observada en nuestra población de estudio explica que la etiología más frecuente del infarto cerebral fuese la cardioembólica (39,1%) y probablemente también sea la razón de la gravedad de los infartos (NIHSS media de 12,3) y de su mal pronóstico funcional (mRS media de 3,4). Esta gravedad y mal pronóstico probablemente también esté en relación con la elevada edad de los pacientes estudiados ($78,6 \pm 13,1$ años).

La distribución etiológica de los ictus según la clasificación TOAST puso de manifiesto que la causa más frecuente fue la cardioembólica (39,1%) como ya hemos referido, seguida de la aterotrombótica (30,4%), lacunar (13%), indeterminada (17,4%) e inusual (4,3%).

Respecto al tratamiento previo destaca que más de la mitad de los pacientes estudiados, el 60,9% estaba en tratamiento antitrombótico (antiagregante o anticoagulante) y el 41,3% en tratamiento con estatinas en el momento de padecer el infarto cerebral, sin diferencias entre sexos. Esto evidencia que la mayoría de los pacientes eran personas con un riesgo cardiovascular elevado y que estaban con tratamiento preventivo para eventos vasculares. En efecto, el 29,3% de los pacientes había tenido previamente algún episodio de isquemia cerebral, permanente o transitoria.

Relación entre concentración de fibrinógeno y situación funcional de los pacientes.

Nuestro trabajo pone de manifiesto que los niveles de fibrinógeno medidos en las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas se correlacionan con la situación funcional al alta, de forma que aquellos pacientes con cifras de fibrinógeno más elevadas tienen puntuaciones más altas en la escala mRS (coeficiente de correlación 0,2; $p < 0,03$).

Existen resultados discordantes en la literatura en cuanto a la utilidad de las concentraciones de fibrinógeno como marcador pronóstico. Algunos estudios no encuentran relación de sus niveles con la tasa de recanalización ni con el pronóstico funcional en pacientes tratados con rTPA [232]. Sin embargo, la mayor parte de estudios están en la línea de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en los que se demuestra que niveles más elevados de fibrinógeno tras un infarto cerebral se relacionan con peor pronóstico (muerte o dependencia) [74,93,239,240]. También se ha demostrado que concentraciones más bajas de fibrinógeno predicen una mejor respuesta al tratamiento con rTPA, con menor mortalidad. Un estudio realizado por González Conejero y cols. [241] demostró que el tener niveles más elevados de fibrinógeno al ingreso en los pacientes con infarto cerebral se relacionaba con una mayor mortalidad.

El papel deletéreo del fibrinógeno aumentaba en asociación con determinados polimorfismos genéticos relacionados con el factor XIII.

La explicación del peor pronóstico del infarto cerebral en pacientes con niveles más altos de fibrinógeno parece estar relacionada con la estructura del trombo. Es posible que los trombos formados en presencia de altas concentraciones de fibrinógeno estén compuestos por fibras más firmemente agrupadas, sean menos porosos y teóricamente más resistentes a la fibrinólisis que aquellos trombos formados con menores cantidades de fibrinógeno [242,243].

Al analizar los niveles de fibrinógeno en función del sexo evidenciamos que eran más elevados en las mujeres que en los hombres ($450,4 \pm 123,9$ vs $387,6 \pm 112,4$ mg/dl respectivamente; $p 0,02$). Este dato, aunque no se ha estudiado de forma extensa y no se ha replicado en otras poblaciones [244], podría ser una causa más en la explicación del hecho contrastado de que las mujeres que padecen un infarto cerebral tienen mayor mortalidad y mayor riesgo de dependencia que los hombres que sufren esta patología [245].

Relación entre niveles de citoquinas con la gravedad del ictus y la situación funcional de los pacientes.

En este estudio analizamos la relación de la IL-6, IL-1 α , IL-1 β y TNF- α con la gravedad de la isquemia cerebral al ingreso y con el pronóstico funcional al alta. La IL-6 y el TNF- α son las citoquinas que se han relacionado de una manera más directa con el pronóstico del ictus, ya que parecen actuar de forma directa sobre las metaloproteinasas cerebrales [52].

Dado que las infecciones se han postulado como un factor relacionado con la aparición del infarto cerebral, y puesto que la IL-6 y otras citoquinas se elevan en la infección, cabría pensar que la elevación de los niveles de citoquinas fuera secundaria a la presencia de infecciones [246,247]. Por este motivo, para evitar este potencial factor de confusión, en nuestro trabajo se excluyeron los pacientes con infecciones documentadas en la semana previa a padecer el infarto cerebral.

Al analizar la concentración de IL-6 en las primeras 24 horas del inicio de los síntomas en función de la gravedad inicial del infarto, observamos que los pacientes con puntuaciones de NIHSS ≥ 6 tenían valores mayores de IL-6 ($4,2 \pm 1$ pg/ml) que aquellos con NIHSS < 6 ($3,5 \pm 0,4$ pg/ml; $p 0,02$). Resultados similares se obtuvieron al analizar las concentraciones de IL-6 en función de la situación funcional al alta, de forma que al estudiar los niveles de IL-6 en los grupos de pacientes con dependencia e independencia funcional, detectamos que los pacientes con una situación de independencia funcional tenían concentraciones más bajas que aquellos que quedaban dependientes ($3,4 \pm 0,5$ vs $4,2 \pm 0,9$ pg/ml, respectivamente; $p 0,01$).

En pacientes con infartos más graves y con mayor discapacidad evidenciamos una tendencia a valores más elevados de TNF- α , sin que los resultados alcanzasen significación estadística. En los pacientes con NIHSS < 6 la concentración media fue de $2,4 \pm 0,8$ pg/ml, mientras que en los pacientes con NIHSS ≥ 6 fue de $2,7 \pm 1,3$ pg/ml ($p 0,49$). En aquellos funcionalmente independientes al alta mRS ≤ 2 , las concentraciones de TNF- α fueron de $2,2 \pm 0,9$ pg/ml y en los pacientes con mRS > 2 fueron de $2,8 \pm 1,2$ pg/ml ($p 0,25$).

También encontramos una tendencia a concentraciones mayores de IL-1 α en los pacientes con mayores puntuaciones NIHSS. En este caso las concentraciones fueron de $2,5 \pm 0,8$ pg/ml en pacientes con NIHSS < 6 y $3,1 \pm 0,9$ pg/ml en pacientes con NIHSS ≥ 6 ($p 0,20$). Respecto al análisis de IL-1 β , las concentraciones fueron similares en los grupos analizados.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la IL-6 puede utilizarse como marcador de gravedad y pronóstico de los pacientes con isquemia cerebral. Además, es posible que otras citoquinas (IL-1 α , IL-1 β y TNF- α) pudieran ser también utilizadas en este sentido. Es importante destacar que la IL-6 tiene su concentración plasmática pico en las primeras 24 horas de la clínica [131], por lo que su cuantificación en estas primeras horas permitiría utilizarlo como un marcador pronóstico precoz, desde los primeros síntomas clínicos, permitiendo aplicar medidas terapéuticas más agresivas desde el inicio.

Existen resultados contradictorios en cuanto al papel fisiopatológico de las citoquinas en la isquemia cerebral, y en cuanto a su utilidad como marcador pronóstico en este contexto. Algunos estudios no evidencian diferencias en los niveles de IL-6 según la situación clínica. En un trabajo experimental publicado en el año 2.000 [248] no se encontraron diferencias en el tamaño del infarto ni en la situación funcional en ratones sometidos a isquemia cerebral comparando un grupo de ratones mutados, en los que por un defecto de translación no se detectaba IL-6 en suero ni en LCR. Sin embargo, otros estudios ofrecen resultados que apuntan en el mismo sentido que los obtenidos en nuestro trabajo. Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de IL-6, IL-1 β y TNF- α , entre otros, son más altos en pacientes que en controles, y que estos niveles se correlacionan de forma positiva con la gravedad del ictus [75,203]. Una publicación reciente del grupo de Vila y cols. [109] puso de manifiesto que los pacientes con isquemia cerebral que padecían deterioro neurológico precoz tenían niveles de IL-6 plasmáticos y en LCR significativamente más altos que los que no sufrían este deterioro clínico. En este estudio también se demostró que las concentraciones plasmáticas de IL-6 se relacionaban con las de TNF- α y que los pacientes con deterioro neurológico precoz tenían concentraciones más elevadas de TNF- α , pero sin alcanzar valores estadísticamente significativos. También se ha demostrado que los pacientes con ictus severo, valorado por la puntuación en la escala NIHSS al ingreso y a los 3 meses, tienen niveles plasmáticos de IL-6 más elevados que aquellos con ictus leve-moderado [132].

Distribución de polimorfismos en genes de moléculas proinflamatorias.

Al estudiar el polimorfismo **-174 GC del gen de la IL-6** se observaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre el grupo de pacientes y el grupo control, de forma que el alelo C (genotipos GC y CC) fue más frecuente en el grupo de pacientes. En este grupo el genotipo GG estaba presente en el 33,3% y los genotipos GC+CC en el 66,7%. En el grupo control la frecuencia del genotipo GG fue de 63% y la de los genotipos GC+CC de 37% (p 0,04).

Existen resultados diversos en cuanto a la distribución genotípica de este polimorfismo en personas con infarto cerebral y en controles. Nuestros resultados son

consistentes con los datos de la literatura en estudios llevados a cabo en población española [140,141], en los que se determinó que los pacientes con ictus de etiología lacunar presentan una mayor frecuencia del alelo C y del genotipo CC en posición -174 del promotor del gen de la IL-6. Sin embargo otros trabajos observan mayor frecuencia del alelo G en los pacientes con infarto cerebral [16,249].

Una revisión de la literatura en el año 2.007 reafirma estos datos, poniendo de manifiesto las diferentes relaciones del polimorfismo -174GC del gen de la IL-6 con el infarto cerebral. Así se describen 2 estudios que relacionan el alelo G con la presencia de infarto cerebral, y 4 estudios que relacionan esta patología con el alelo C [149]. El alelo C se ha asociado en ocasiones con una mayor expresión del gen de la IL-6 y consecuentemente con niveles más altos de esta interleuquina [143], mientras que otros trabajos relacionan este alelo con niveles más bajos de IL-6 [144], o no encuentran diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 en grupos con diferentes genotipos [145].

Encontramos hallazgos contradictorios al estudiar este polimorfismo -174 GC del gen de la IL-6 en los distintos grupos de gravedad y pronóstico. La frecuencia del alelo C fue mayor en pacientes con ictus menos graves, pero por el contrario fue más frecuente en los pacientes con peor situación funcional al alta. No encontramos una explicación clara a este hecho, y no podemos establecer conclusiones determinantes al respecto. Es posible que el alto porcentaje de pacientes con ictus cardioembólico tenga que ver en estos resultados. Este tipo de ictus es el que probablemente tiene una menor relación con el polimorfismo descrito, y teniendo en cuenta el resto de resultados obtenidos en este trabajo es probable que con un mayor número de pacientes se pueda establecer una relación de dicho alelo con mayor gravedad del infarto.

No existen muchos trabajos en la literatura que analicen este aspecto. Cabe destacar un estudio que relaciona la presencia del genotipo GG con puntuaciones más altas en la escala NIHSS y con peor situación funcional al alta, con mRS de 4 y 5 [146]. Sin embargo no están incluidos en esa relación el grupo de pacientes con dependencia funcional con mRS de 3. Además en este trabajo se incluyen únicamente pacientes

menores de 60 años, con ictus e isquemia cerebral transitoria, por lo que los resultados no son estrictamente comparables con los nuestros.

No hemos encontrado relación de la distribución del resto de polimorfismos estudiados (polimorfismo -889 CT en el gen de la IL-1 α , polimorfismos -511 CT y +3954 CT en el gen de la IL-1 β y polimorfismo -238 GA en el gen del TNF- α) con el diagnóstico de infarto cerebral. Aunque existe evidencia de su relación con enfermedades inflamatorias, su relación con la isquemia cerebral es controvertida.

El alelo T en posición -889 del gen de la IL-1 α se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer isquemia cerebral en población coreana, aunque no existen resultados similares en otras poblaciones. [154,164]. En nuestro trabajo no se encuentra asociación en la distribución del polimorfismo **-889 CT del gen de la IL-1 α** entre la población control y la población de pacientes con ictus isquémico.

Tampoco se evidencia relación del polimorfismo **-511 CT del gen de la IL-1 β** en ambos grupos, de la misma forma que ocurre en otros estudios [161], aunque también existe algún trabajo con resultados opuestos, en los que el alelo T se asocia con la isquemia cerebral de pequeño vaso [165].

Del mismo modo hay resultados contradictorios en relación con el polimorfismo **-238GA del TNF- α** y la isquemia cerebral. En algún caso se ha relacionado con la presencia de ictus isquémico [177], mientras que en otros no se ha encontrado esta relación [171], de forma similar a lo observado en nuestro trabajo.

Todos estos resultados discrepantes pueden ser el resultado de la compleja fisiopatología de las citoquinas, de la gran cantidad de interacciones que se establecen entre los distintos participantes en los mecanismos de inflamación y de isquemia cerebral, además de las diferencias entre diferentes poblaciones y distintas metodologías de los estudios. Además es importante destacar que la etiología más frecuente del ictus en los pacientes estudiados en nuestro grupo fue la cardioembólica, en la que la patología intravascular crónica, que es la que más se asocia con las mutaciones

descritas, probablemente tenga un papel menos relevante que en los ictus de causa aterotrombótica o lacunar.

Relación de las concentraciones de IL-6 con el uso previo de estatinas.

Se encontraron valores menores de TNF- α en pacientes con estatinas ($1,5\pm 0,5$ pg/ml frente a $2,9\pm 1,0$ pg/ml; $p 0,01$). También se detectaron concentraciones más bajas de IL-6 en aquellos pacientes que estaban en tratamiento con estatinas antes del infarto, respecto a los que no las tomaban ($3,2\pm 0,3$ vs $4,1\pm 0,9$ pg/ml; $p 0,008$), y llamativamente se detectaron niveles más bajos de IL-6 en pacientes con antecedentes de DL frente a los no dislipémicos ($3,4 \pm 0,3$ vs $4,1\pm 0,9$ pg/ml; $p 0,02$).

En esta afirmación atrae la atención el hecho de que los pacientes dislipémicos tuvieran niveles más bajos de IL-6 que los que no lo eran, pero es probable que esto sea debido, al menos en parte, a que una de las condiciones para clasificar a un paciente como dislipémico fue que estuviera en tratamiento con estatinas, por lo que las estatinas pudieran tener un efecto antiinflamatorio y disminuir los niveles de IL-6 en los pacientes con DL. Esta explicación se sustenta además al observar que los pacientes que tenían tratamiento con estatinas previamente a sufrir el ictus tenían niveles más bajos de IL-6. En este grupo se incluyen los pacientes con DL pero también los que usaban estatinas como prevención secundaria en casos de cardiopatía isquémica o ictus previo.

Estos resultados están en concordancia con algunos trabajos en los que el tratamiento con estatinas atenúa la relación entre enfermedad cardio y cerebrovascular y aumento de marcadores plasmáticos de inflamación, entre otros la IL-6 [250].

Sin embargo, no encontramos relación entre el uso previo de estatinas con la gravedad del infarto ni con el pronóstico funcional, lo que sí está descrito ampliamente en la literatura [231,251]. Es posible que la falta de asociación se deba al bajo número de pacientes analizados, y que la magnitud de la asociación sea mayor al ampliar el estudio en el futuro con un mayor número de pacientes.

Como conclusión, podemos destacar que nuestra población de estudio está constituida por pacientes de edad avanzada, con infartos cerebrales graves (puntuación

media de 12,3, en la escala NIHSS al ingreso) y con mala situación funcional al alta (puntuación media de 3,4 en la escala mRS al alta). Esta gravedad de los infartos está muy probablemente relacionada con la etiología cardioembólica, que es la más frecuente en la serie, y con la elevada edad de los pacientes analizados. Los infartos cardioembólicos son frecuentemente más graves, porque afectan a territorios más extensos, y tienen consecuentemente un peor pronóstico funcional. Hay algunos estudios que demuestran niveles más elevados de IL-6 y TNF- α en ictus de causa cardioembólica que en ictus de otras etiologías [75,107].

Las relaciones de las concentraciones iniciales de fibrinógeno y de IL-6 con mayor gravedad y peor pronóstico funcional, pueden permitir seleccionar un grupo de pacientes de alto riesgo. Además es posible que otros marcadores, tales como IL-1 α , IL-1 β y TNF- α puedan tener utilidad en este contexto. Asimismo sería interesante evaluar a los pacientes de forma prospectiva, con un análisis de su situación funcional a medio plazo para determinar si existe relación con los niveles de citoquinas determinados en las primeras horas de los síntomas.

También hemos observado que el tratamiento previo con estatinas parece disminuir el estado inflamatorio en relación a la isquemia cerebral, como lo demuestra el hecho de que las concentraciones de IL-6 y de TNF- α sean menores en el grupo de pacientes que tomaba previamente este fármaco. Queda por determinar si esto se relaciona de forma significativa con un mejor pronóstico funcional, para lo que creemos importante aumentar el tamaño de la muestra en próximos estudios.

La mayor frecuencia del alelo C en posición -174 del gen de la IL-6 en pacientes con infarto cerebral podría también ayudar a caracterizar este grupo de pacientes con mayor riesgo de enfermedad cerebrovascular.

Por tanto, el análisis de estos factores permitiría seleccionar de forma más estricta a aquellos pacientes de alto riesgo y peor pronóstico, en los que se podrían aplicar medidas terapéuticas más agresivas y quizás aumentar las indicaciones de tratamientos farmacológicos, con estatinas y otros fármacos.

CONCLUSIONES

1. La población estudiada de pacientes con ictus presentó una frecuencia elevada de factores de riesgo vascular, de los que destaca la HTA. Un porcentaje alto de pacientes tienen antecedentes de FA, lo que se relaciona con el elevado porcentaje de ictus de etiología cardioembólica de nuestra serie. Los pacientes analizados presentaron infartos cerebrales graves y con mal pronóstico funcional.

2. Los niveles de fibrinógeno en las primeras 24 horas tras el ictus se relacionan con puntuaciones mayores en la escala de Rankin al alta, de forma que los pacientes con concentraciones mayores de fibrinógeno al ingreso tienen un peor pronóstico funcional. Los niveles de IL-6 en las primeras 24 horas de la isquemia cerebral se correlacionan de forma positiva con mayores puntuaciones en la escala NIHSS al ingreso y con puntuaciones más altas en la escala de Rankin al alta.

3. El alelo C en posición -174 del gen de la IL-6 se relaciona con un riesgo mayor de presentar infarto cerebral. No se ha evidenciado esta asociación con los polimorfismos -889 CT en el gen de la IL-1 α , -511 CT y +3954 CT en el gen de la IL-1 β ni -238 GA en el gen del TNF- α . No existe una relación concluyente entre los diferentes genotipos estudiados con la gravedad del infarto y el pronóstico funcional.

4. La toma de estatinas previamente a padecer un infarto cerebral se correlaciona con niveles más bajos de IL-6 en el momento agudo de la isquemia. No hemos encontrado relación entre el consumo previo de estatinas y la gravedad o el pronóstico funcional tras el ictus.

ANEXOS

1. ESCALA NIHSS (Tomado de Montaner J. y Álvarez Sabin J.) [217]**1a. Nivel de conciencia**

0. Vigil, nivel de conciencia normal (alerta)
1. Responde a estímulos verbales (somnoliento)
2. Responde sólo a estímulos dolorosos o repetitivos (estuporoso)
3. Respuestas reflejas o ausencia de respuesta (coma)

1b. Orientación

0. Dos respuestas correctas
1. Una respuesta correcta
2. Ninguna respuesta correcta

1c. Respuesta a órdenes verbales

0. Dos respuestas correctas
1. Una respuesta correcta
2. Ninguna respuesta correcta

2. Mirada conjugada horizontal

0. Normal
1. Paresia parcial de la mirada, sobrepasa la línea media
2. Paresia completa

3. Campo visual

0. Normal
1. Cuadrantanopsia
2. Hemianopsia homónima
3. Hemianopsia homónima bilateral, ceguera total

4. Paresia facial

0. Normal
1. Paresia leve
2. Parálisis parcial
3. Parálisis completa

5. Fuerza extremidad superior (5a: izquierda; 5b: derecha)

0. Normal
1. Claudica contra gravedad, pero resiste más de 10 segundos
2. Claudica contra gravedad, pero resiste menos de 10 segundos
3. No levanta contra gravedad
4. No hay movimiento

6. Fuerza extremidad inferior (6a: izquierda; 6b derecha)

0. Normal
1. Claudica contra gravedad, pero resiste más de 5 segundos
2. Claudica contra gravedad, pero resiste menos de 5 segundos
3. No levanta contra gravedad
4. No hay movimiento

7. Dismetría

0. No hay disimetría
1. Dismetría en una extremidad
2. Dismetría en dos extremidades

8. Sensibilidad

0. Normal
1. Hipoestesia leve-moderada
2. Hipoestesia grave-anestesia

9. Lenguaje

0. Normal
1. Afasia leve
2. Afasia grave (el interlocutor mantiene el peso de la conversación)
3. Mutismo

10. Disartria

0. Normal
1. Disartria leve. Lenguaje comprensible
2. Disartria grave. Lenguaje incomprensible, anartria

11. Extinción o inatención

0. No hay
1. Inatención o extinción en una de las modalidades (visual, táctil, auditiva, espacial o corporal)
2. Grave o más de una modalidad

2. ESCALA DE RANKIN MODIFICADA (mRS) [222]

0. Asintomático

1. Sin incapacidad importante

2. Incapacidad leve para realizar alguna de sus actividades previas, que las realiza con dificultad pero sin precisar ayuda

3. Incapacidad moderada. Necesita alguna ayuda

4. Incapacidad moderadamente grave. Sin necesidad de atención continua

5. Incapacidad grave. Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche

6. Muerte

BIBLIOGRAFÍA

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121: e46-e215.
2. National Heart, Lung, and Blood Institute. Incidence and prevalence: 2006 chart book on cardiovascular and lung diseases. Bethesda, MD: National Institute of Health; 2006.
3. Di Carlo A, Launer L. J, Breteler M. M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J et al. Frequency of stroke in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. ILSA Working Group and the Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 2000; 54(Suppl 5): S28-33.
4. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte año 2009. Nota de prensa 4 de julio de 2011. <http://www.ine.es/prensa/np664.pdf> [Consultado el 8/8/2012]
5. Rosamond W, Folsom AR, Chambless LIE, Wang C-H, Mc Govern PG, Howard G et al. Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort. *Stroke* 1999; 30: 736-743.
6. Asplund K et al , Stegmayr B, Peltonen M. From the twentieth to the twenty-first century: a public health perspective on stroke. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Malden, Mass: Blackwell Science; 1998:2.
7. Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel L.J, Braun LT, Chaturvedi S. et al. Guidelines for the primary prevention of stroke. A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 42: 517-584.
8. Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G et al. Primary prevention of ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 2001; 32: 280-299.
9. Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 1996; 27: 373-380.
10. 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. *J. Epidemiol* 1998; 147: 259-268.
11. 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* 2004; 35: 426-431.
12. Lackland DT, Egan BM, Ferguson PL. Low birth weight as a risk factor for hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2003; 5: 133-136.

13. Barker DJP, Lackland DT. Prenatal Influences on Stroke Mortality in England and Wales. *Stroke* 2003; 34:1598-1602.
14. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Proinflammatory gene polymorphisms and ischemic stroke. *Curr Pharmaceutical Design* 2008; 14: 3590-3600.
15. Flossman E, Schulz UGR, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 212-227.
16. Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G et al. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 2270-2275.
17. Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Ichihara S, Kato K. et al. Genetic risk for ischemic and hemorrhagic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1920-1925.
18. Carter AM, Catto AJ, Grant PJ. Association of the alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation. *Circulation* 1999; 99:2423-2426.
19. Arenillas JF, Massot A, Alvarez-Sabín J, Fernandez-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Chacon P et al. C-reactive protein gene C1444T polymorphism and risk of recurrent ischemic events in patients with symptomatic intracranial atherostenoses. *Cerebrovasc Dis* 2009; 28:95-102.
20. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003; 289:2560-2572.
21. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet.* 1990; 335: 827-838.
22. Centers for Disease Control (CDC). The Surgeon General's 1989 Report on Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1989;38 Suppl 2:1-32.
23. Fagerström K. The epidemiology of smoking: health consequences and benefits of cessation. *Drugs.* 2002; 62 Suppl 2:1-9.
24. Thomas P. Guide to Clinical Preventive Services: Report of the US Preventive Services Task Force. *JAMA* 1996; 276:923-924.
25. Hansson GK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1):328-31.

26. 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* 2007; 298: 309-316.
27. Sanossian N, Saver JL, Navab M, Ovbiagele B. High-density lipoprotein cholesterol: an emerging target for stroke treatment. *Stroke* 2007; 38:1104-1109.
28. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991; 22: 983-988.
29. Gage BF, Waterman AD, Shannon W, Boechler M, Rich MW, Radford MJ. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA* 2001; 285:2864-2870.
30. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA et al. CC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to revise the 2001 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006; 114: e257-354.
31. 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* 1997; 28: 1507-1517.
32. Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J et al. Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363:1491-1502.
33. Jones A, Granger S, Brambilla D, Gallagher D, Vichinsky E, Woods G et al. Can peak systolic velocities be used for prediction of stroke in sickle cell anemia? *Pediatr Radiol* 2005; 35:66-72.
34. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation* 2007; 115:1481-1501.
35. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; 308:1583-1587.
36. Slooter AJ, Rosendaal FR, Tanis BC, Kemmeren JM, van der Graaf Y, Algra A. Prothrombotic conditions, oral contraceptives, and the risk of ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1213-1217.
37. Stamler J, Rose G, Stamler R, Elliott P, Dyer A, Marmot M. INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. *Hypertension* 1989; 14: 570-577.

38. Appel LJ, Brands MW, Daniels SR, Karanja N, Elmer PJ, Sacks FM; American Heart Association. Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 2006; 47: 296-308.
39. Lakka TA, Salonen JT. Moderate to high intensity conditioning leisure time physical activity and high cardiorespiratory fitness are associated with reduced plasma fibrinogen in eastern Finnish men. *J Clin Epidemiol* 1993; 46:1119-1127.
40. Wang JS, Jen CJ, Chen HI. Effects of exercise training and deconditioning on platelet function in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1668-1674.
41. Rångemark C, Hedner JA, Carlson JT, Glerup G, Winther K. Platelet function and fibrinolytic activity in hypertensive and normotensive sleep apnea patients. *Sleep* 1995; 18:188-194.
42. Williams PT. High-density lipoprotein cholesterol and other risk factors for coronary heart disease in female runners. *N Engl J Med* 1996; 334:1298-1303.
43. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373:1083-1096.
44. Lindsberg PJ, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34:2518-2532.
45. Rajamani K, Fisher M, Fisher M. Atherosclerosis: pathogenesis and pathophysiology. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Malden, Mass: Blackwell Science; 1998:308–318.
46. Chamorro A. Role of inflammation in stroke and atherothrombosis. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17 (Suppl 3):1-5.
47. Blann AD, Tse W, Maxwell SJ, Waite MA. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J Hypertens* 1994; 12: 925-928.
48. Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR et al. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34:113-117.
49. Hölschermann H, Terhalle HM, Zakel U, Maus U, Parviz B, Tillmanns H et al. Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives. *Thromb Haemost* 1999; 82:1614-1620.
50. Bergmann S, Siekmeier R, Mix C, Jaross W. Even moderate cigarette smoking influences the pattern of circulating monocytes and the concentration of sICAM-1. *Respir Physiol* 1998; 114:269-275.
51. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55:310-318.

52. Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis* 2004;17 (Suppl 1):7-18.
53. Castellanos M, Serena J. Applicability of biomarkers in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007; 24 (Suppl 1):7-15.
54. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis *N Engl J Med* 1976; 295:369-377.
55. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
56. Álvaro-González LC, Freijo-Guerrero MM, Sádaba-Garay F. Mecanismos inflamatorios, arterioesclerosis e ictus isquémico: datos de interés clínico y perspectivas. *Rev Neurol* 2002; 35:452-462.
57. Franks ZG, Campbell RA, Weyrich AS, Rondina MT. Platelet-leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207:11-17.
58. Chamorro A, Hallenbeck J. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke* 2006; 37:291-293.
59. Charlier P, Huynh I. Assessment of Atherosclerosis in Egyptian Mummies. *JAMA* 2010; 303:1149-1150.
60. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; 66:232-245.
61. del Zoppo GJ, Gorelick PB. Innate inflammation as the common pathway of risk factors leading to TIAs and stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207:8-10.
62. Rodríguez-Yáñez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 353-357.
63. Ishikawa M, Cooper D, Russell J, Salter JW, Zhang JH, Nanda A et al. Molecular determinants of the prothrombotic and inflammatory phenotype assumed by the postischemic cerebral microcirculation. *Stroke* 2003; 34:1777-1782.
64. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 3574-3589.
65. Carter DB, Deibel MR Jr, Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL et al. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 1990; 344:633-638.
66. Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol* 1995; 147:1477-1486.

67. Vila N, Filella X, Deulofeu R, Ascaso C, Abellana R, Chamorro A. Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. *Neurol Sci* 1999; 162:185-188.
68. Shie FS, Neely MD, Maezawa I, Wu H, Olson SJ, Jürgen Günther et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Present in Astrocytes Surrounding Cerebral Infarcts and Stimulates Astrocyte Interleukin-6 Secretion. *Am J Pathol* 2004; 164: 1173–1181.
69. Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *Cereb Blood Flow Metab.*2009; 29:464-479.
70. Smith CJ, Emsley HC, Vail A, Georgiou RF, Rothwell NJ, Tyrrell PJ et al. Variability of the systemic acute phase response after ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2006; 251:77-81.
71. Nakase T, Yamazaki T, Ogura N, Suzuki A, Nagata K. The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2008; 271:104-109.
72. Toulmond S, Vige X, Fage D, Benavides J. Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. *Neurosci Lett* 1992; 144:49-52.
73. Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem* 2005; 94:459-68.
74. Welsh P, Barber M, Langhorne P, Rumley A, Lowe GD, Stott DJ. Associations of inflammatory and haemostatic biomarkers with poor outcome in acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27:247-53.
75. Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Serio A, D'Aguanno G, La Placa S et al. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol* 2009; 215:84-89.
76. Welsh P, Lowe GD, Chalmers J, Campbell DJ, Rumley A, Neal BC et al. Associations of proinflammatory cytokines with the risk of recurrent stroke. *Stroke* 2008; 39:2226-2230.
77. Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23:103-114.

78. Pettigrew LC, Kindy MS, Scheff S, Springer JE, Kryscio RJ, Li Y et al. Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat. *J Neuroinflammation* 2008; 5:47.
79. Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res* 2001; 902:171-177.
80. Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol* 1995; 56:127-134.
81. Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995; 26:661-665.
82. Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, Türeyen K, Vemuganti R. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem* 2003; 87: 586-597.
83. Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, Endo N, Tanabe H, Katsuura Y et al. *Leukoc Biol* 1999; 65:744-749.
84. Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:1213-1224.
85. Schilling M, Strecker JK, Schäbitz WR, Ringelstein EB, Kiefer R. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 2009; 161:806-812.
86. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89-95.
87. 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; 107:499-511.
88. Foerch C, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH. Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 2009; 73:393-399.
89. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 1987; 257:2318-2324.
90. Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 2004; 35:1147-1152.
91. Wilhelmsen L, Svärdsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1984; 311:501-505.

92. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-979.
93. Di Napoli M, Papa F, Bocola V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32:133-138.
94. Di Napoli M, Papa F; Villa Pini Stroke Data Bank Investigators. Inflammation, hemostatic markers, and antithrombotic agents in relation to long-term risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients. *Stroke* 2002; 33:1763-1771.
95. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010; 375:132-140.
96. Patterson CC, Smith AE, Yarnell JW, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe GD. The associations of interleukin-6 (IL-6) and downstream inflammatory markers with risk of cardiovascular disease: the Caerphilly Study. *Atherosclerosis* 2010; 209:551-557.
97. Woodward M, Rumley A, Tunstall-Pedoe H, Lowe GD. Associations of blood rheology and interleukin-6 with cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol* 1999; 104:246-257.
98. Castillo J, Alvarez-Sabín J, Martínez-Vila E, Montaner J, Sobrino T, Vivancos J et al. Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J Neurol* 2009; 256:217-224.
99. Chalela JA, Kidwell CS, Nentwich LM, Luby M, Butman JA, Demchuk AM et al. Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison. *Lancet* 2007; 369:293-298.
100. Marín J, Abella J, Leira R, Aneiros A, Serena J, Dávalos A et al. Marcadores bioquímicos de los signos tomográficos precoces de isquemia cerebral. *Neurología* 2001; 16:448.
101. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem* 2003; 49:1733-1739.
102. Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004; 35:57-63.
103. Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, White WD, Lynch JR. Panel of biomarkers predicts stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053:30.

104. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC; BRAIN Study Group. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke* 2009; 40:77-85.
105. Suwanwela NC, Chutinet A, Phanthumchinda K. Inflammatory markers and conventional atherosclerotic risk factors in acute ischemic stroke: comparative study between vascular disease subtypes. *J Med Assoc Thai* 2006; 89:2021-2027.
106. Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, Furukado S, Hougaku H, Hori M. Relation between interleukin-6 level and subclinical intracranial large-artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 197:326-332.
107. Tuttolomondo A, Pinto A, Corrao S, Di Raimondo D, Fernandez P, Di Sciacca R et al. Immuno-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic variables associated with acute ischemic stroke diagnosis. *Atherosclerosis* 2009; 203:503-508.
108. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke* 2008; 39:2280-2287.
109. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 2000; 31:2325-2329.
110. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol* 2004; 4:2.
111. Sotgiu S, Zanda B, Marchetti B, Fois ML, Arru G, Pes GM et al. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur J Neurol* 2006; 13:505-513.
112. Audebert HJ, Rott MM, Eck T, Haberl RL. Systemic inflammatory response depends on initial stroke severity but is attenuated by successful thrombolysis. *Stroke* 2004; 35:2128-2133.
113. Rosell A, Alvarez-Sabín J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernández-Cadenas I, et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke* 2005; 36:1415-1420.
114. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997; 28:1956-1960.
115. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term

outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol* 2005; 62:1130-1134.

116. Castillo J, Dávalos A, Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997; 349:79-83.

117. Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar JM, Castellanos M, Dávalos A. Neurological deterioration in acute lacunar infarctions: the role of excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Stroke* 2001; 32:1154-1161.

118. Castillo J, Leira R. Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* 2001; 11 (Suppl 1):40-48.

119. Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, Steinmetz H et al. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2004; 35:2160-2164.

120. Serena J, Blanco M, Castellanos M, Silva Y, Vivancos J, Moro MA et al. The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers. *Stroke* 2005; 36:1921-1926.

121. The NINDS t-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke* 1997; 28:2109-2118.

122. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33:831-836.

123. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995; 26:2120-2126.

124. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003; 107:598-603.

125. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34:40-46.

126. Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J et al. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:1671-1676.

127. Foerch C, Wunderlich MT, Dvorak F, Humpich M, Kahles T, Goertler M et al. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke* 2007; 38:2491-2495.

128. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Quintana M et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke* 2004; 35:2123-2127.
129. Kazmierski R, Guzik P, Ambrosius W, Ciesielska A, Moskal J, Kozubski W. Predictive value of white blood cell count on admission for in-hospital mortality in acute stroke patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2004; 107:38-43.
130. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30:981-985.
131. Shenhar-Tsarfaty S, Assayag EB, Bova I, Shopin L, Berliner S, Shapira I et al. Early signaling of inflammation in acute ischemic stroke: clinical and rheological implications. *Thromb Res* 2008; 122:167-173.
132. Worthmann H, Tryc AB, Goldbecker A, Ma YT, Tountopoulou A, Hahn A et al. The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc Dis* 2010; 30:85-92.
133. Bak S, Gaist D, Sindrup SH, Skytthe A, Christensen K. Genetic liability in stroke: a long-term follow-up study of Danish twins. *Stroke* 2002; 33:769-774.
134. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischaemic stroke. *Brain* 2000; 123:1784-812
135. Hademenos GJ, Alberts MJ, Asad I, Mayberg M, Shepard T, Jagida A et al. Advances in the genetics of cerebrovascular disease and stroke. *Neurology* 2001; 56:99-108
136. Brenner D, Labreuche J, Touboul PJ, Schmidt-Petersen K, Poirier O, Perret C et al. Cytokine polymorphisms associated with carotid intima-media thickness in stroke patients. *Stroke* 2006; 37:1691-1696.
137. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 – 174G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001; 22:2243-2252
138. Ishishara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:357-368
139. Wernstedt I, Eriksson AL, Berndtsson A, Hoffstedt J, Skrtic S, Hedner T et al. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:1272-1279
140. Revilla M, Obach V, Cervera A, Dávalos A, Castillo J, Chamorro A. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. *Neurosci Lett* 2002; 324:29-32.

141. Chamorro A, Revilla M, Obach V, Vargas M, Planas AM. The -174G/C polymorphism of the interleukin 6 gene is a hallmark of lacunar stroke and not other ischemic stroke phenotypes. *Cerebrovasc Dis* 2005; 19:91-95.
142. Jenny NS, Tracy RP, Ogg MS, Luong le A, Kuller LH, Arnold AM et al. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:2066-2071.
143. Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gliuca F, Luciani N, Zamparelli R et al. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol* 2001; 88:1125-1128.
144. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Clin Invest* 1998; 102:1369-1376.
145. Rauramaa R, Väisänen SB, Luong LA, Schmidt-Trücksäss A, Penttilä IM, Bouchard C et al. Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2657-2662.
146. 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. *Thromb Res* 2003; 110:181-186.
147. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83:113-118.
148. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275:18138-18144.
149. Tso AR, Merino JG, Warach S. Interleukin-6 174G/C polymorphism and ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2007; 38:3070-3075.
150. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87:2095-2147.
151. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Førre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 38:221-228.
152. di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet* 1992; 1:450.

153. Bioque G, Crusius JB, Koutroubakis I, Bouma G, Kostense PJ, Meuwissen SG et al. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995; 102:379-383.
154. Um JY, Moon KS, Lee KM, Kim HM. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in cerebral infarction. *Cytokine* 2003; 23:41-46.
155. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1976-1983.
156. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404:398-402.
157. Read RC, Camp NJ, di Giovine FS, Borrow R, Kaczmarek EB, Chaudhary AG et al. An interleukin-1 genotype is associated with fatal outcome of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2000; 182:1557-1560.
158. Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmüller F et al. Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology* 2000; 55:480-483.
159. McGeer PL, McGeer EG. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2001; 58:1790-1792.
160. Pociot F, Mølviq J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22:396-402.
161. Zee RY, Hennessey H, Michaud SE, Ridker PM. Genetic variants within the interleukin-1 gene cluster, and risk of incident myocardial infarction, and ischemic stroke: a nested case-control approach. *Atherosclerosis* 2008; 201:124-129.
162. Seripa D, Dobrina A, Margaglione M, Matera MG, Gravina C, Vecile E et al. Relevance of interleukin-1 receptor antagonist intron-2 polymorphism in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2003; 15:276-281.
163. Dziedzic T, Slowik A, Pera J, Szczudlik A. Lack of association between interleukin-1 beta polymorphism (-511) and ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:170-171.
164. Um JY, Moon KS, Lee KM, Yun JM, Cho KH, Moon BS et al. Association of interleukin-1 alpha gene polymorphism with cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 115:50-54.
165. Dziedzic T, Slowik A, Pera J, Szczudlik A. Interleukin 1 beta polymorphism (-511) and risk of stroke due to small vessel disease. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20:299-303.

166. Mizia-Stec K, Gasior Z, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E et al. Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis* 2003; 14:431-438.
167. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; 5:315-329.
168. Araújo F, Pereira AC, Mota GF, Latorre Mdo R, Krieger JE, Mansur AJ. The influence of tumor necrosis factor -308 and C-reactive protein G1059C gene variants on serum concentration of C-reactive protein: evidence for an age-dependent association. *Clin Chim Acta* 2004; 349:129-134.
169. Sookoian SC, González C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. *Obes Res* 2005; 13:2122-2131.
170. Harcos P, Laki J, Kiszal P, Széplaki Z, Szolnoki Z, Kovács M et al. Decreased frequency of the TNF2 allele of TNF-alpha -308 promoter polymorphism is associated with lacunar infarction. *Cytokine* 2006; 33:100-105.
171. Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, Endler G, Greisenegger S, Marculescu R et al. Polymorphisms of the inflammatory system and risk of ischemic cerebrovascular events. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:918-923.
172. Rubattu S, Speranza R, Ferrari M, Evangelista A, Beccia M, Stanzione R et al. A role of TNF-alpha gene variant on juvenile ischemic stroke: a case-control study. *Eur J Neurol* 2005; 12:989-993.
173. Pereira TV, Rudnicki M, Franco RF, Pereira AC, Krieger JE. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: a meta-analysis. *Am Heart J* 2007; 153:821-830.
174. Sharma S, Ghosh B, Sharma SK. Association of TNF polymorphisms with sarcoidosis, its prognosis and tumour necrosis factor (TNF)-alpha levels in Asian Indians. *Clin Exp Immunol* 2008; 151:251-259.
175. Reich K, Mössner R, König IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C. Promoter Polymorphisms of the Genes Encoding Tumor Necrosis Factor- and Interleukin-1 are Associated with Different Subtypes of Psoriasis Characterized by Early and Late Disease Onset *J Invest Dermatol* 118: 155-163.
176. Achrol AS, Pawlikowska L, McCulloch CE, Poon KY, Ha C, Zaroff JG et al. Tumor necrosis factor-alpha-238G>A promoter polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. *Stroke* 2006; 37:231-234.
177. Llamas Sillero P, Fernández de Velasco Casarrubios J, García-Raso A, Meseguer Gancedo E, Santos Montero AB, Tomás Martínez JF. Polymorphism -238

G/A of tumor necrosis factor alpha gene promoter is a genetic risk factor for ischemic cerebrovascular disease. *J Mol Neurosci* 2007; 32:108-110.

178. Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Kondo I et al. Polymorphism of the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) gene is associated with the plasma level of MCP-1 but not with carotid intima-media thickness. *Hypertens Res* 2003; 26:677-683.

179. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004; 110:2204-2209.

180. Fletcher B, Berra K, Ades P, Braun LT, Burke LE, Durstine JL et al. Managing abnormal blood lipids: a collaborative approach. *Circulation* 2005; 112:3184-3209.

181. Tapia-Perez H, Sanchez-Aguilar M, Torres-Corzo J, Rodriguez-Leyva I, Herrera-Gonzalez LB. Estatinas y mecanismos de protección cerebral. *Rev Neurol* 2007; 45:359-364.

182. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.

183. Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke* 2004; 35:2902-2909.

184. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1301-1307.

185. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; 335:1001-1009.

186. White HD, Simes RJ, Anderson NE, Hankey GJ, Watson JD, Hunt D et al. Pravastatin therapy and the risk of stroke. *N Engl J Med* 2000; 343:317-326.

187. Pedersen TR, Kjekshus J, Pyörälä K, Olsson AG, Cook TJ, Musliner TA et al. Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Am J Cardiol* 1998; 81:333-335.

188. Byington RP, Davis BR, Plehn JF, White HD, Baker J, Cobbe SM et al. Reduction of stroke events with pravastatin: the Prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation* 2001; 103:387-392.

189. Liao JK. Statins and ischemic stroke. *Atheroscler Suppl* 2002; 3:21-25.

190. Fonseca FA, França CN, Póvoa RM, Izar MC. Estatinas y accidente cerebrovascular: posibles mecanismos de acción de la protección neurovascular. *Rev Neurol* 2010; 51:551-560.
191. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1712-1719.
192. Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC. Differential regulation by cytokines of human astrocyte nitric oxide production. *Glia* 1995; 15:491-494.
193. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97:1129-1135.
194. Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 2004; 35(Suppl 1):2708-2711.
195. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273:24266-24271.
196. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272:31725-31729.
197. Yang Z, Kozai T, van der Loo B, Viswambharan H, Lachat M, Turina MI et al. HMG-CoA reductase inhibition improves endothelial cell function and inhibits smooth muscle cell proliferation in human saphenous veins. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1691-1697.
198. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *Biol Chem* 1999; 274:21926-21931.
199. Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1-10.
200. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103:276-283.
201. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001; 344:1959-1965.
202. Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik A. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol* 2001; 77:247-53.

203. Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 1996; 18:669-675.
204. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1212-1217.
205. Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gómez-Hernández A, Muñoz-García B, Vega M, Serrano J et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke* 2005; 36:1796-1800.
206. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 2003; 53:743-751.
207. Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:281-290.
208. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. ASPECTS Study Group. Alberta Stroke Programme Early CT Score. *Lancet* 2000; 355:1670-1674.
209. 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* 1993; 24:35-41.
210. Castillo V, Bogousslavsky J. Early Classification of Stroke. *Cerebrovasc Dis* 1997; 7(Suppl.3):5-11
211. Arboix A, Alvarez-Sabín J, Soler L en nombre del Comité de Redacción ad hoc del Grupo de estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. *Neurología* 1998; 13 (supl 3): 3-10.
212. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Alvarez-Sabín J en nombre del Comité de Redacción ad hoc del Grupo de estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Ictus. Tipus etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurología* 2002; 17 (Supl 3): 3-12.
213. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989; 20:864-870.
214. Goldstein LB, Bertels C, Davis JN. Interrater reliability of the NIH stroke scale. *Arch Neurol* 1989; 46:660-662.

215. Leifer D, Bravata DM, Connors JJ 3rd, Hinchey JA, Jauch EC et al. Metrics for measuring quality of care in comprehensive stroke centers: detailed follow-up to Brain Attack Coalition comprehensive stroke center recommendations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 42:849-877.
216. Adams HP Jr, Davis PH, Leira EC, Chang KC, Bendixen BH, Clarke WR et al. Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Neurology* 1999; 53:126-131.
217. Montaner J, Alvarez-Sabín J. La Escala del ictus del National Institute of Health (NIHSS) y su adaptación al español. *Neurología* 2006; 21:192-202.
218. Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol* 2006; 5:603-612.
219. Martin-Schild S, Albright KC, Tanksley J, Pandav V, Jones EB, Grotta JC et al. Zero on the NIHSS does not equal the absence of stroke. *Ann Emerg Med* 2011; 57:424-425.
220. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 1988; 19:604-607.
221. Cote R, Hachinski VC, Shurvell BL, Norris JW, Wolfson C. The Canadian Neurological Scale: A Preliminary Study in Acute Stroke. *Stroke* 1986; 17:731-737.
222. Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J* 1957 May; 2:200-215.
223. Bonita R, Beaglehole R. Recovery of motor function after stroke. *Stroke* 1988; 19:1497-1500.
224. Lev MH, Segal AZ, Farkas J, Hossain ST, Putman C, Hunter GJ et al. Utility of perfusion-weighted CT imaging in acute middle cerebral artery stroke treated with intra-arterial thrombolysis: prediction of final infarct volume and clinical outcome. *Stroke* 2001; 32:2021-2028.
225. De Haan R, Horn J, Limburg M, Van Der Meulen J, Bossuyt P. A comparison of five stroke scales with measures of disability, handicap, and quality of life. *Stroke* 1993; 24:1178-1181.
226. Burn JP. Reliability of the modified Rankin Scale. *Stroke* 1992; 23:438.
227. Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:656-661.

228. Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, D'Orazi A, Panniteri G, Montali A et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica* 2003; 88:54-60.
229. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1997; 26:143-146.
230. Wilson AG, de Vries N, van de Putte LB, Duff GW. A tumour necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:601-603.
231. Alvarez-Sabín J, Huertas R, Quintana M, Rubiera M, Delgado P, Ribó M et al. Prior statin use may be associated with improved stroke outcome after tissue plasminogen activator. *Stroke* 2007; 38:1076-1078.
232. Martí-Fàbregas J, Borrell M, Cocho D, Belvís R, Castellanos M, Montaner J et al. Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA. *Neurology* 2005; 65:366-370.
233. Cortina MG, Campello AR, Conde JJ, Ois A, Voustianiouk A, Téllez MJ et al. Monocyte count is an underlying marker of lacunar subtype of hypertensive small vessel disease. *Eur J Neurol* 2008; 15:671-676.
234. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 2003; 289:2363-2369.
235. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación), Sociedad Española de Diabetes, Federación Española de Diabetes Estudio di@bet.es. Barcelona, 12 de abril de 2011. Disponible en: http://www.ciberdem.org/pdfs/Nota%20de%20prensa_Estudio%20Diabetes_Ciberdem.pdf. [consultado el 8/8/12]
236. Vegazo O, Banegas JR, Civeira F, Serrano P, Luengo E, Mantilla T. Prevalencia de las dislipemias en consultas ambulatorias del sistema sanitario español. Estudio HISPALIPID. *Med Clin (Barc)* 2006; 127:331-4.
237. Corrao MA, Guindon GE, Cokkinides V, Sharma N. Building the evidence base for global tobacco control. *Bull World Health Organ* 2000; 78:884-890.
238. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001; 285:2370-2375.
239. del Zoppo GJ, Levy DE, Wasiewski WW, Pancioli AM, Demchuk AM, Trammel J et al. Hyperfibrinogenemia and functional outcome from acute ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40:1687-1691.

240. Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Liakos GK, Krania E, Kremastinos DT. Usefulness of inflammatory and haemostatic markers to predict short-term risk for death in middle-aged ischaemic stroke patients. *Acta Neurol Scand* 2008; 117:415-420.
241. González-Conejero R, Fernández-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabín J et al. Role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism in thrombolytic therapy in stroke patients. *Stroke* 2006; 37:2288-2293.
242. Collet JP, Soria J, Mirshahi M, Hirsch M, Dagonnet FB, Caen J et al. Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood* 1993; 82:2462-2469.
243. Lim BC, Ariëns RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003; 361:1424-1431.
244. Bogar L, Juricskay I, Kesmarky G, Feher G, Kenyeres P, Toth K. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35:99-103.
245. Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2003; 12:119-126.
246. Grau AJ, Buggle F, Steichen-Wiehn C, Heindl S, Banerjee T, Seitz R et al. Clinical and biochemical analysis in infection-associated stroke. *Stroke* 1995; 26:1520-1526.
247. Grau AJ, Buggle F, Heindl S, Steichen-Wiehn C, Banerjee T, Maiwald M, Rohlf M, Suhr H, Fiehn W, Becher H, et al. Recent infection as a risk factor for cerebrovascular ischemia. *Stroke* 1995; 26:373-379.
248. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 2000; 31:1715-1720.
249. 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* 2003; 34:881-885.
250. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Szarek M, Waters DD et al. Inflammation, statin therapy, and risk of stroke after an acute coronary syndrome in the MIRACL study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:142-147.
251. Biffi A, Devan WJ, Anderson CD, Cortellini L, Furie KL, Rosand J et al. Statin treatment and functional outcome after ischemic stroke: case-control and meta-analysis. *Stroke* 2011; 42:1314-1