

TESIS DOCTORAL

IMPACTO PRONÓSTICO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA
EN PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO TRATADOS CON
TRATAMIENTO TROMBOLÍTICO ENDOVENOSO :

ESTUDIO CLÍNICO Y DE BIOMARCADORES

AUTOR:

ANA ISABEL CALLEJA SANZ

DIRECTOR:

JUAN FRANCISCO ARENILLAS LARA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
2013





El Dr. Arenillas como director de la tesis

CERTIFICA:

Que **Ana I. Calleja Sanz** ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral titulada: “Impacto pronóstico de la resistencia a la insulina en pacientes con ictus isquémico tratados con tratamiento trombolítico endovenoso: estudio clínico y de biomarcadores”, la cual se ha desarrollado en el Departamento de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firma el certificado a 28 de Enero de 2013.

Firmado

Dr. Juan Francisco Arenillas Lara

La presente tesis se ha desarrollado en el Departamento de Neurología, Unidad de Ictus del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, con el soporte de un contrato de investigación Río-Hortega, cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III y el Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

***“La única simplicidad que vale la pena conservar es la del corazón,
la simplicidad que acepta y goza”.***

G. K. Chesterton, 1874-1936

A ti, PAPÁ; porque siempre te siento cerca.

AGRADECIMIENTOS

Nunca he creído en el azar ni en las casualidades; tampoco en el logro inmediato ni en ningún tipo de cénit que no sea el resultado de un trabajo arduo, serio y que exija intrínsecamente un constante esfuerzo y dedicación. Y en esta creencia en que la vida es un continuo aprendizaje, he adquirido el firme compromiso de seguir evolucionando personal y profesionalmente, con ilusión renovada pese a los óbices que puedan plantearse y teniendo siempre presente el bienestar de los pacientes. A ellos, “mis pacientes”, va dedicado el presente trabajo.

La consecución de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo incondicional del director de la misma, el Dr. Juan F. Arenillas. Desde el primer momento confió en mi persona y me brindó la inestimable oportunidad de formar parte de su equipo. Le agradezco su infatigable empeño en implantar una Unidad de Ictus en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y enseñarme que el objetivo de la misma es alcanzar la excelencia tanto en el plano asistencial como en el campo de la investigación. GRACIAS JUAN, por tantos momentos compartidos y por seguir aprendiendo de ti y contigo; por contagiarme tu entusiasmo por el trabajo bien hecho, y por estar siempre dispuesto a enseñarme con humildad y sencillez, capacidad sólo innata en personas de inteligencia incuestionable.

A la Dra. Rosario Fernández-Herranz, que habiéndome visto crecer desde que comencé dando mis primeros pasos en el hospital como residente,

y gracias a su lucha, me ha permitido ver hacerse realidad el sueño compartido de instaurar una Unidad de Ictus en nuestro Centro.

A todos mis compañeros de la Unidad Neurovascular, porque trabajar con ellos resulta tan sencillo... A Elisa, gracias por la ilusión de verte crecer en la Neurología a mi lado y en especial por ser, más que mi compañera, mi amiga. A Pablo, por tu actitud emprendedora, luchando por ampliar tu formación en neurointervencionismo para optimizar nuestro trabajo en la Unidad. A Javier, nuestro coordinador de investigación, por ser auténtico, y por tu ilusión por aprender y enseñarnos a ser rigurosos en la metodología de la investigación.

En esta cadena de agradecimientos no podía faltar una especial mención al resto de mis compañeros del servicio de Neurología, adjuntos y residentes. A los primeros, gracias por vuestro compañerismo y por todo lo aprendido en estos años de esfuerzo compartido. A los segundos, gracias por vuestro constante interés y porque, con vuestra curiosidad insaciable, renováis mi afán por seguir aprendiendo.

A todo el equipo de enfermería, muy en especial a nuestras enfermeras de la Unidad de Ictus. A Edita, gracias por tu diplomacia, tu esfuerzo y tu lucha continua, apoyando siempre nuestro trabajo. A Rosa, gracias por estar siempre al lado de nuestros pacientes y hacer de la calidad asistencial un objetivo logrado; gracias por tu enorme esfuerzo personal y profesional, pero sobre todo gracias por todo el cariño que me das. A Lourdes, nuestra enfermera de consulta, por tu complicidad, tus gestos y tus palabras de afecto.

Me gustaría mencionar al Dr. Enrique González-Sarmiento, del servicio de Medicina Interna, por su inestimable colaboración en la puesta en marcha de los cimientos de esta tesis, por sus incansables ganas de seguir trabajando, su talento y su cercanía.

Deseo expresar mi agradecimiento al equipo del Dr. Demchuk, del Foothills Medical Center, Calgary (Canadá), donde durante un año tuve el placer de ahondar en mi labor investigadora y asistencial, afrontando nuevos retos profesionales que me han permitido madurar en el campo de la patología neurovascular.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Joan Montaner y su equipo del Laboratorio de Investigación Institut Recerca Hospital Vall d' Hebron (Barcelona), que me acercaron a la investigación básica en la patología cerebrovascular, permitiéndome anexionar a mi enfoque clínico de la neurología la disciplina de la visión básica, aspecto esencial en el desarrollo de esta tesis.

A todos aquéllos que con su eficaz trabajo contribuyen a que el día a día resulte más fácil. A Ángela, gracias por tu coraje, tu generosidad con todos y en especial con “tu niña”, como tú me dices.

Por último, gracias a mi familia y amigos, que siempre habéis estado a mi lado, compartiendo mis logros y desilusiones. A mi hermana María, por llevarme de tu mano y enseñarme con tu ejemplo a luchar y a seguir adelante en la vida con una sonrisa, y por la inmensa confianza que tienes depositada en mí. A Sergio, no sólo por comprender sin cuestionar, sino también por involucrarte en mi trabajo, porque no dejas de sorprenderme cada segundo y porque a tu lado no hay camino difícil; gracias por ser tan especial.

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

ACA: Arteria cerebral anterior

ACM: Arteria cerebral media

ACP: Arterial cerebral posterior

AG: Ácidos grasos

AGNE: Ácidos grasos no esterificados

AGL: Ácidos grasos libres

AACE: American Association of Clinical Endocrinologist

AHA: American Heart Association

ATH: Aterotrombótico

ATPIII: Grupo Americano Adult Pannel Treatment III

AUROC: Área bajo la curva

CE: Cardioembólico

COR (curva): en inglés ROC, Receiver Operator Characteristic Curve

DEDAS: Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke

DIAS: Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke

DM: Diabetes mellitus

DTC: Doppler transcraneal

DTTC: Duplex transcraneal

ECASS: European Cooperative Acute Stroke Study

EGIR: European Group for study of Insulin Resistance

EMEA: Agencia Europea del Medicamento

FDA: Food and Drug Administration

GIP: Polipéptido Inhibidor Gástrico

GLIAS: The Glycemia in Acute Stroke Study

GLP1: Péptido similar al glucagón tipo 1

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HTA: Hipertensión arterial

HOMA: Homeostasis model assessment

IL: Interleuquina

ICAM 1: Molécula-1 de adhesión intracelular

IDF: International Diabetes Foundation

IMC: Índice de masa corporal

IRS: Insulin receptor substrate

iv: Intravenoso

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

NHANES III: The Third National Health and Nutrition Examination Survey

NINDS: National Institute of Neurological Disorders and Stroke

PA: Activador del plasminógeno

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1

PCR: Proteína C reactiva

SEEDO: Sociedad Española para el estudio de la Obesidad

SICH: Transformación hemorrágica sintomática

SITS-MOST: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study

SM: Síndrome metabólico

OMS: Organización Mundial de la Salud

TA: Tensión arterial

TAD: Tensión arterial diastólica

TAS: Tensión arterial sistólica

TC: Tomografía computerizada

TG: Triglicéridos

TIBI: Thrombolysis in Brain Ischemia

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TOAST: Trial of Org 10712 in Acute Stroke Treatment

tPA: Activador tisular del plasminógeno

TSA: Troncos supraaórticos

VCAM1: Molécula de adhesión vascular

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VIVA: Variability of Insulin with Visceral Adiposity

ÍNDICE

Agradecimientos	I
Índice de Acrónimos	II
Índice General	III
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL ICTUS ISQUÉMICO	1
1.1.1 Epidemiología	2
1.1.2 Terapias de reperfusión	2
1.1.3 Problema clínico: Resistencia a la trombosis en el ictus isquémico. Factores que influyen en la resistencia a trombolisis	10
1.2 SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA	16
1.2.1 Concepto de síndrome metabólico. Historia y definición actual	16
1.2.2 Concepto de la resistencia a la insulina	20
1.2.3 Epidemiología.....	21
1.2.4 Fisiopatología del síndrome metabólico y la resistencia a la insulina	24
1.2.5 Métodos diagnósticos de resistencia a la insulina	48
1.3 ICTUS, SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA	50
1.3.1 Factor de riesgo de Ictus	50
1.3.2 Aterosclerosis intra-extracraneal	52
1.3.3 Factor pronóstico del ictus	55
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
3 METODOLOGÍA	71
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	71
3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES	71
3.3 MUESTRA ESTUDIADA	76
3.4 VARIABLES CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS BASALES	77

3.5	ESTUDIO ULTRASONOGRÁFICO	79
3.5.1	Eco-doppler de TSA	79
3.5.2	Eco-doppler/doppler TC	79
3.6	VARIABLES PRONÓSTICAS	82
3.7	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA MEDIANTE EL ÍNDICE DE HOMA	83
3.8	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA	84
3.9	ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE AMBOS ESTUDIOS.....	85
3.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87
4	RESULTADOS	93
4.1	CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.....	93
4.2	PERFIL TEMPORAL DE LOS BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA	97
4.3	EVOLUCIÓN FUNCIONAL A LOS TRES MESES.....	101
4.3.1	Resistencia a la insulina, mediante el índice de homa, y pronóstico a largo plazo	101
4.3.2	Biomarcadores relacionados con la resistencia a la insulina y pronóstico a largo plazo	105
4.4	RESISTENCIA A LA RECANALIZACIÓN ARTERIAL.....	110
4.4.1	Resistencia a la insulina, mediante el índice de HOMA, y resistencia a la recanalización arterial a las 24 horas tras tPA.....	110
4.4.2	Biomarcadores relacionados con la resistencia a la insulina y resistencia a la recanalización arterial a las 2horas tras tPA.	111
4.5	VOLUMEN DE LA HIPODENSIDAD.....	111
4.5.1	Resistencia a la insulina, mediante el índice de HOMA, y volumen de la hipodensidad.....	111
4.5.2	Biomarcadores relacionados con la resistencia a la insulina y volumen de la hipodensidad.....	112

4.6	TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA SINTOMÁTICA.....	116
4.6.1	Resistencia a la insulina, mediante el índice de homa, y transformación hemorrágica sintomática.....	116
4.6.2	Biomarcadores relacionados con la resistencia a la insulina y transformación hemorrágica sintomática.....	116
4.7	PRONÓSTICO A CORTO PLAZO (MEJORÍA NEUROLÓGICA PRECOZ) Y BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA.....	117
5	SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	125
5.1	RESISTENCIA A LA INSULINA Y PRONÓSTICO FUNCIONAL A LARGO PLAZO.....	125
5.2	RESISTENCIA A LA INSULINA Y RESISTENCIA A LA RECANALIZACIÓN ARTERIAL.....	126
5.3	RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y EL PRONÓSTICO INDEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE GLUCEMIA.....	128
5.4	PERFIL TEMPORAL EN FASE AGUDA DEL ICTUS DE LOS BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA.....	130
5.5	NIVELES DE GIP Y PRONÓSTICO A CORTO Y LARGO PLAZO.....	131
5.6	OTROS BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y VARIABLES PRONÓSTICAS: LEPTINA, GRELINA, TNF α E IL-6.....	133
5.7	LIMITACIONES.....	135
6	CONCLUSIONES.....	141
7	BIBLIOGRAFÍA.....	145
8	ANEXOS.....	165
8.1	ANEXO I: CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS.....	165
8.2	ANEXO II: CLASIFICACIÓN TOAST Y ALGORITMO DIAGNÓSTICO.....	170
8.3	ANEXO III: ESCALA NIHSS (ESCALA DE ICTUS DEL NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH).....	171
8.4	ANEXO IV: ESCALA RANKIN MODIFICADA.....	174
8.5	ANEXO V: COPIA DE LAS PUBLICACIONES.....	175
8.5.1	Artículo I. Insulin resistance is associated with a poor response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke.....	175

8.5.2 Artículo II. Blood biomarkers of insulin resistance in acute stroke patients treated with intravenous thrombolysis: Temporal profile and prognostic value182



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL ICTUS ISQUÉMICO

El ictus se define como una alteración, transitoria o permanente, en una o varias zonas del parénquima encefálico, causada por un trastorno circulatorio cerebral. De forma genérica el ictus puede ser isquémico, debido a una falta de aporte sanguíneo, o hemorrágico, secundario a la extravasación de sangre. El primero de ellos representa el 85% del total de la patología cerebrovascular y resulta como consecuencia de una oclusión arterial que provoca la interrupción brusca del aporte sanguíneo a una zona del parénquima encefálico. En el momento en que el grado de hipoperfusión cerebral alcanza unos niveles que no son suficientes para mantener un metabolismo y funcionamiento celular adecuados, se provoca un fenómeno de disfunción transitoria o definitiva de las células afectadas, que se denomina isquemia cerebral. Cuando la isquemia es prolongada, el daño celular es irreversible, y se aplica el término infarto cerebral. El tejido cerebral es muy sensible a la isquemia, y el desarrollo de la muerte celular es claramente tiempo-dependiente. La velocidad del crecimiento del área de infarto es muy variable entre los distintos pacientes y depende sobre todo de la duración e intensidad de la isquemia, aunque hay muchos otros factores relacionados como el grado de circulación colateral, presión de perfusión cerebral, glucemia sérica, temperatura corporal y factores genéticos. Teniendo en cuenta esto, uno de los aspectos esenciales en el abordaje de la patología cerebrovascular, reside en la actuación precoz.

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La patología cerebrovascular constituye uno de los problemas de salud más importantes de la sociedad occidental. La incidencia anual del ictus, se estima de 200 casos por cada 100.000 habitantes, con una prevalencia entre 500 y 600 casos por cada 100.000 habitantes. En España se diagnostican unos 150.000 nuevos casos por cada año. Además esta patología tiene una elevada morbi-mortalidad, constituyendo la primera causa de discapacidad física en la población adulta, la primera causa de mortalidad en la mujer y la segunda en el varón.

Con el aumento de la esperanza de vida, y el envejecimiento de la población, la tendencia de estas cifras ya alarmantes será creciente. Por lo tanto la búsqueda de nuevas estrategias que contribuyan a disminuir la morbimortalidad derivada de la patología cerebrovascular debe ser un objetivo fundamental de la investigación médica.

1.1.2 TERAPIAS DE REPERFUSIÓN

La estrategia terapéutica más efectiva en el tratamiento del ictus isquémico agudo es la reperfusión precoz. En este sentido, el tratamiento trombolítico ha marcado un punto de inflexión en Neurología respecto al manejo del ictus en su fase aguda, y su objetivo es acelerar la disolución del trombo mediante la potenciación de la actividad fibrinolítica intrínseca^{1,2}. En la actualidad, el Tpa es el único fármaco aprobado para el tratamiento del ictus isquémico agudo, a raíz de los resultados de los ensayos NINDS I y II que

fueron dos ensayos clínicos randomizados, controlados con placebo, que demostraron un 30% más de probabilidad de ausencia de discapacidad o discapacidad mínima a los tres meses, en los pacientes tratados con 0.9mg/Kg de tPA en las 3 horas siguientes al inicio de los síntomas³. Gracias a estos ensayos la FDA aprobó en 1996 el uso del tratamiento trombolítico iv para pacientes con un ictus isquémico agudo de menos de 3 horas de evolución⁴. En Europa, la EMEA aprobó provisionalmente la utilización del tPA en el año 2002, condicionando su aprobación definitiva a la realización de un estudio observacional de seguridad denominado SITS-MOST. Los resultados del SITS-MOST han confirmado la seguridad y eficacia del tratamiento trombolítico con tPA administrado dentro de las tres primeras horas por profesionales acreditados en práctica clínica habitual⁵. Desde septiembre de 2008, tras los resultados obtenidos por el estudio ECASS-3⁶ demostrando la eficacia y seguridad del tPA hasta las 4,5 horas del inicio de la clínica, el tPA iv está actualmente aprobado en dicha ventana terapéutica y la EMEA aprobó recientemente la ampliación de la ventana terapéutica de tPA endovenoso hasta las 4,5 horas, hecho que ya figura en la ficha técnica del fármaco. Más allá de 4,5 horas, en pacientes seleccionados por TC craneal simple, el tratamiento trombolítico por vía sistémica se asocia con incremento de la mortalidad y una mayor tendencia a desarrollar transformación hemorrágica sintomática, por lo que no se ha demostrado un beneficio clínico del tratamiento con tPA iv en esta ventana terapéutica.

Así mismo debe destacarse la publicación reciente del ensayo clínico International Stroke Trial – 3 (IST-3), que incluyó a 3035 pacientes con ictus isquémico de hasta 6 horas de evolución clínica, sin límite de edad, quienes fueron randomizados a tPA iv vs placebo. Si bien el estudio no alcanzó significación en la variable pronóstica primaria (vivo e independiente al tercer

mes, dicotomizado), sí se observó una asociación significativa a favor de tPA en el análisis de regresión logística ordinal. El estudio permite concluir que los pacientes de más de 80 años también se benefician del tratamiento y que probablemente existe un subgrupo de pacientes en los que la ventana podría llegar a las 6 horas. Sin embargo, el tratamiento parece no ser eficaz entre las 3 y las 6 horas en los pacientes mayores de 80 años⁷.

El tratamiento trombolítico iv potencia la actividad fibrinolítica intrínseca del organismo, favoreciendo la disolución del trombo y la recanalización arterial, con lo que se consigue la reperusión precoz del tejido isquémico y se evita la lesión cerebral irreversible. Gracias a ello, el paciente se beneficia de una reducción significativa del déficit neurológico a corto plazo y de un mejor pronóstico funcional^{1,2}.

A pesar de todo esto, la realidad es que sigue siendo un fármaco poco utilizado (aproximadamente el 5% de los ictus agudos), la ventana terapéutica aprobada es corta (< 4,5 horas) y la recanalización arterial completa con la trombolisis sistémica se consigue en menos del 40% de los pacientes tratados (dependiendo de una serie de factores que expondremos en el apartado siguiente). Estos hechos, han motivado el desarrollo de numerosos estudios en diferentes ámbitos.

1.1.2.1 AMPLIACIÓN DE LA VENTANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO CON TROMBOLISIS EN PACIENTES SELECCIONADOS CON TÉCNICAS DE NEUROIMAGEN MULTIMODAL

Una vez superada la ventana terapéutica de 4.5 horas, se entra en el terreno de investigación clínica. En estudios observacionales y ensayos clínicos la administración de alteplase iv entre 4.5 y 6 horas después del inicio de la sintomatología ha demostrado ser tan eficaz y seguro que el tratamiento en ventana terapéutica de 4.5 horas cuando la selección de pacientes se hace mediante criterios de selección de RM multimodal⁸⁻¹⁰ o TC perfusión¹¹. Estas dos técnicas han demostrado ser muy útiles a la hora de identificar la presencia de tejido cerebral potencialmente rescatable, incluso más allá de las 4.5 horas del inicio de la clínica^{12, 13}.

Actualmente se encuentran en desarrollo varios ensayos clínicos con tPA iv en ventana extendida y selección basada en mismatch PWI/DWI, calculando en tiempo real mediante software automáticos: EXTEND (9 horas) y DAWN (ictus del despertar) (Australia), y ECASS-4 (Europa). Existe otro ensayo clínico con tPA en ictus del despertar, desarrollado a través de un consorcio Europeo de fondos del 7 Programa Marco, que emplea el concepto de mismatch entre DWI y FLAIR por resonancia magnética para seleccionar los pacientes (WAKE-UP stroke).

1.1.2.2 NUEVOS FÁRMACOS TROMBOLÍTICOS POR VÍA SISTÉMICA:

Algunos de los nuevos fármacos trombolíticos que están actualmente en estudio, tales como la Desmoteplasa o Tenecteplasa, ofrecen una serie de ventajas sobre el tPA como su mayor afinidad por la fibrina o su vida media más larga. Existen estudios con desmoteplasa en dosis escalonada en fase II DIAS y DEDAS^{14, 15} que mostraban resultados prometedores que no se confirmaron en la fase III DIAS-2¹⁶. Este estudio en fase III incluyó un gran número de pacientes que no presentaban oclusión arterial y con escasa penumbra isquémica, lo cual pudo contribuir a una elevada frecuencia de respuesta positiva en el grupo placebo. Por este motivo, actualmente está en marcha un estudio en fase III con desmoteplasa iv en ventana terapéutica de 9 horas, pero seleccionando a los pacientes en función de la presencia de oclusión arterial. Respecto a la tenecteplasa, actualmente se ha publicado un estudio en fase IIb, que incluyó 75 pacientes randomizados para recibir tratamiento con tPA en dosis habitual frente a tenecteplasa a dosis de 0.1mg o 0.25mg/kg de peso, el cual ha demostrado que el tratamiento con tenecteplasa en ventana terapéutica de 6 horas se asocia a mejor evolución neurológica y mayor tasa de reperfusión comparado con los pacientes aleatorizados a tPA que mostraban tejido en penumbra en el TC perfusión¹⁷.

1.1.2.3 TOMBOLÍTICOS EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS ADYUVANTES:

En la actualidad se está investigando la combinación de fármacos trombolíticos con otros fármacos antitrombóticos, para potenciar su efecto.

Algunos de estos fármacos son (1) Inhibidores directos de la trombina: Argatrobán, en un estudio piloto de seguridad, donde se empleaba combinado con tPA, habiendo demostrado una tasa de SICH de 6.2% en el grupo tratado con argatrobán¹⁸. Así mismo se está estudiando el empleo aislado de argatrobán (estudio ARGIS-1). (2) Antagonista de la glicoproteína GPIIb-IIIa: el estudio ABESST-II obtuvo resultados negativos para el abciximab, debido a que se asoció con un elevado riesgo de transformación hemorrágica¹⁹. En la actualidad se está estudiando la combinación de abciximab con el reteplase (ROSIE), y la combinación de epitibatide y tPA (CLEAR-ER) entre otros. (3) Otros antiagregantes: recientemente se han publicado los resultados del ensayo clínico ARTIS, que pretendía evaluar la eficacia y seguridad de la combinación del tPa iv con 300mg de ácido acetil salicílico. El uso de aspirina iv incrementó el riesgo de complicaciones hemorrágicas, sin asociarse a un mayor beneficio clínico²⁰.

1.1.2.4 FÁRMACOS TROMBOLÍTICOS Ó DISPOSITIVOS DE EXTRACCIÓN MECÁNICA DE TROMBOS A NIVEL INTRAARTERIAL PARA MEJORAR LA EFICACIA DE RECANALIZACIÓN ARTERIAL

Por un lado la fibrinólisis intraarterial es un procedimiento en el que se infunde el fármaco fibrinolítico (alteplase, urokinasa) a nivel local, distal al trombo ó intratrombo mediante técnicas neurointervencionistas, permitiendo alcanzar altas concentraciones de fármaco a nivel local. La eficacia y seguridad de la fibrinólisis intraarterial usada en las primeras 6 horas en pacientes con oclusión de la ACM ha sido evaluada en 3 ensayos clínicos, dos de ellos utilizando pro-urokinasa (PROACT I y II)^{21, 22} y otro con

urokinasa (MELT)²³. La recopilación de los resultados de todos ellos indica que el tratamiento intraarterial se asocia a una menor tasa de muerte o discapacidad a largo plazo comparado con los controles tratados solo con heparina.

Por otro lado, existen técnicas de recanalización arterial que emplean dispositivos endovasculares y que persiguen la fragmentación y extracción del trombo. En la actualidad, disponemos de varias técnicas mecánicas para la extracción de coágulos de las arterias intracraneales. Son varios los estudios que avalan estas técnicas, entre ellos destacan: (1) El estudio MERCI, empleando dispositivo Merci y la técnica de captura²⁴ que demostró una tasa de recanalización de arterias intracraneales del 48% en las primeras 8 horas, tasa significativamente más alta que la esperada usando como control el estudio PROACT II y controles históricos ($p < 0.0001$). (2) El estudio Multi-MERCI²⁵ comparó la terapia combinada con alteplase iv y trombectomía mecánica en las primeras horas del inicio de la clínica frente a pacientes tratados únicamente con trombectomía mecánica, obteniendo en ambos grupos resultados equiparables. (3) El estudio Penumbra, empleando un dispositivo denominado penumbra y la técnica de tromboaspiración²⁶, evaluó 23 pacientes con ictus isquémicos de menos de 8 horas de evolución, y obtuvo una revascularización parcial ó completa del 81,6% de las oclusiones arteriales. (4) Otras series²⁷⁻³⁰ han empleado dispositivos denominados stent retrievers, que son stents extraíbles que permiten una rápida restauración del flujo cerebral y una menor duración de tiempo de intervención. Una reciente revisión de estas series de pacientes tratados con stent retrievers, en la que se incluían 262 casos, reportó tasas de recanalización arterial del 90% en tiempos muy cortos, logrando un 47% de pacientes con un mRS < 2 al tercer mes, y con tasas de mortalidad y SICH del

7% y 11% respectivamente. El estudio Swift³¹, un estudio randomizado multicéntrico y controlado que comparó la eficacia y seguridad de MERCI vs. Solitaire, mostrando una clara superioridad del Solitaire en todos los indicadores: recanalización Solitaire 60% vs. MERCI 24,1%, buen pronóstico 58% vs. 33%. Así mismo el estudio Trevo2³² demostró una clara superioridad, tanto en la tasa de recanalización como en el buen pronóstico funcional a los 3 meses, del stentriver Trevo sobre el Merci.

Además existe la modalidad de trombólisis combinada que pretende asociar por un lado la rapidez en el inicio del tratamiento sistémico y en un segundo tiempo el probable beneficio de un mayor grado de recanalización con el procedimiento intraarterial, en aquellos pacientes que el tratamiento iv no haya sido eficaz. Los fármacos utilizados en los primeros estudios fueron la alteplase y la urokinasa por vía intraarterial, y la alteplase por vía iv. El estudio EMS comparó terapia iv e intraarterial combinada frente a trombolisis intraarterial en las 3 primeras horas del inicio de la clínica, demostrando que la terapia combinada puede ofrecer más grado de recanalización que la terapia intraarterial aislada³³. Los estudios IMS I y II³⁴ compararon pacientes tratados con dosis reducidas de tPA iv (0.6 mg/kg en 30 minutos) en las 3 primeras horas del inicio de la clínica, seguidas en caso de presencia de un coágulo residual de trombolisis intraarterial con tPA en las 5 horas siguientes, con los pacientes tratados con tPA iv del estudio NINDS. En el primero de ellos, IMS I, se concluyó que la terapia combinada es segura, aunque no más eficaz que la iv aislada. El IMS II incorporó la aplicación de ultrasonidos con el dispositivo EKOS durante la infusión de tPA intraarterial, obteniendo tasas de recanalización superiores al IMS (73% vs 56%), pero sin diferencias significativas en el pronóstico a largo plazo. El estudio en fase III, randomizado, IMS-III pretendía evaluar si la recanalización mediante la

combinación de trombólisis endovenosa con dispositivos de trombectomía mecánica de primera generación (MERCi, no stent-retrievers) era superior al tratamiento trombolítico endovenoso sólo dentro de las tres primeras horas desde el inicio de los síntomas. Sin embargo este estudio ha sido detenido el pasado abril por futilidad. En este resultado negativo seguramente han influido problemas de diseño del estudio y el empleo de dispositivos ya obsoletos³⁵. Se encuentran en desarrollo varios ensayos clínicos con pacientes seleccionados en base a la demostración de una oclusión arterial proximal intracraneal, que intentan comparar la trombectomía mecánica usando stent-retrievers con el mejor tratamiento médico, uno de ellos desarrollado íntegramente en nuestro país (REVASCAT).

1.1.3 PROBLEMA CLÍNICO: RESISTENCIA A LA TROMBOSIS EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESISTENCIA A TROMBOLISIS

Con todo lo expuesto en el apartado anterior, desgraciadamente aunque el paciente pueda recibir tratamiento con trombólisis iv, en menos del 50% de los casos se alcanzará la independencia funcional a los 3 meses. La principal causa de esta mala respuesta es la ausencia de recanalización arterial precoz; debido a que se ha demostrado que la recanalización arterial tras el tratamiento trombolítico es un potente predictor de mejoría clínica precoz y de buen pronóstico funcional a largo plazo^{1, 36, 37}. A pesar de que el estudio NINDS y otros ensayos randomizados con trombólisis iv, en sus variables no incluyeron información sobre el estado de las arterias, gracias a diversos estudios se sabe que la tasa de recanalización tras la administración iv de tPA dentro de las primeras tres horas se incrementa hasta un 40-60%,

frente a un 24% en caso de una recanalización espontánea³⁸. Un metaanálisis publicado en el 2007³⁸ concluyó que la recanalización arterial aumenta entre 4 y 5 veces la probabilidad de buen pronóstico funcional, disminuyendo en una proporción similar la probabilidad de muerte a los tres meses. En términos de neuroimagen, la recanalización arterial se asocia con la disminución del crecimiento del infarto y en algunos casos con la reversibilidad de la lesión isquémica¹². Por el contrario, la ausencia de recanalización se ha relacionado con una peor evolución clínica a corto plazo y un mal pronóstico funcional, así como con un mayor crecimiento de la lesión isquémica establecida^{39, 40}.

Se han identificado varios factores que se asocian con la falta de recanalización, que en términos generales estarían en relación con el potencial fibrinolítico intrínseco del individuo, el tamaño/composición del trombo o factores hemodinámicos^{41, 42}. Se podrían dividir en dos subgrupos:

1.1.3.1 LOCALES

Localización del trombo: se considera uno de los factores determinantes en la respuesta a la trombólisis en oclusiones agudas. Parece que sólo un 25 % de los pacientes con oclusión proximal de ACM recanalizan, o lo que es peor solo un 10% de las oclusiones de ACI intracraneal (oclusión en T)⁴³.

Longitud del trombo: es probablemente un marcador de la localización del trombo; de forma que los trombos con mayor volumen se localizan más proximales y resultan más resistentes a la lisis⁴⁴.

Composición del trombo: la composición física y biomolecular del trombo, probablemente sea otro factor fundamental; de manera que los trombos formados en situaciones de éstasis sanguíneo, como en las cavidades cardiacas, son más ricos en fibrina y más fáciles de lisar que los constituidos en zonas de turbulencia arterial sobre una lesión arterioesclerótica de base, que son más ricos en plaquetas y más difíciles de lisar^{41, 45}. Un estudio reciente ha mostrado que los trombos que son más hiperdensos en el TC (medido con unidades Hounsfield), son más susceptibles a la lisis con tPA, lo cual parece que está en relación a la composición del trombo en términos de fibrina y eritrocitos⁴⁶.

Flujo residual a través del trombo: la presencia de flujo residual a través de una arteria parcialmente ocluida, parece estar asociada con una tasa mayor de recanalización en pacientes con ictus tratados con tPA iv⁴⁷.

Factores hemodinámicos locales: tales como la presencia de Estenosis/Oclusión de la arteria carótida interna homolateral que puede condicionar una disminución de perfusión del tPA⁴⁸; o la circulación colateral, que sería la responsable del mantenimiento del flujo sanguíneo en el árbol arterial distal a la oclusión jugando un papel importante en la recanalización arterial⁴⁹. En este sentido nuestro grupo ha publicado recientemente un trabajo en el que se describe una escala de colaterales leptomenígeas determinadas en la imagen fuente del TC perfusión y su correlación con la recanalización arterial⁵⁰.

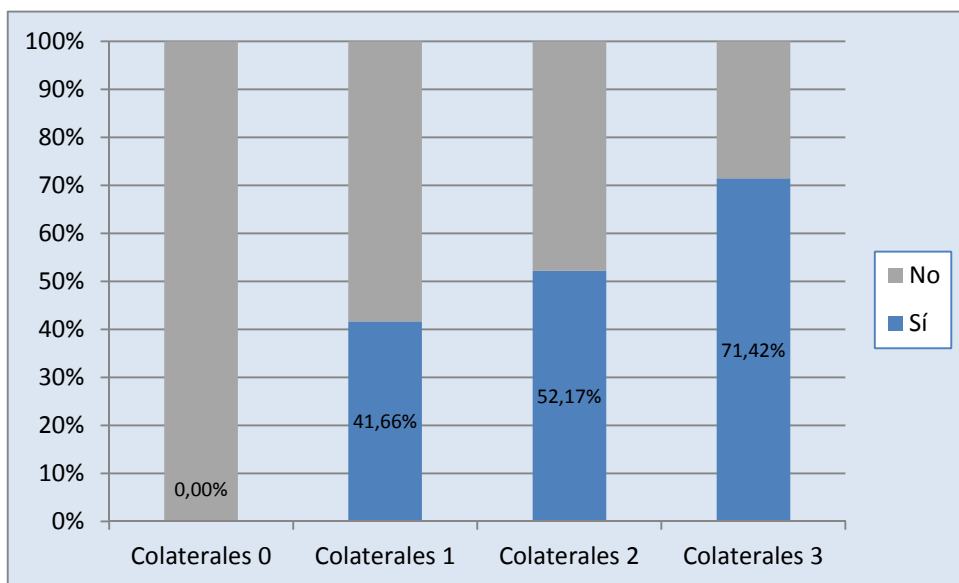


Figura 1: Relación entre colaterales leptomeníngicas determinadas en la imagen fuente del TC perfusión y la probabilidad de recanalización arterial.

Modificada de Calleja et al, European Journal of Neurology 2012.

1.1.3.2 SISTÉMICOS

Por su parte, los factores sistémicos también podrían influir en la recanalización arterial.

Hiper glucemia: la relevancia de la hiper glucemia resulta cada vez más evidente, porque afecta a casi el 50% de los pacientes con ictus agudo. Es un factor que además de afectar al tejido isquémico potencialmente viable, puede también dificultar la recanalización arterial inhibiendo la fibrinólisis⁵¹.

Factores hemodinámicos sistémicos (PA o gasto cardíaco): que pueden influir en la presión de perfusión del fibrinolítico. Hay algunos estudios que

muestran como pacientes con fibrilación auricular y elevado ProBNP por fallo cardiaco tiene menor tasa de recanalización^{52, 53}.

Subtipo etiológico del ictus: algunos estudios han remarcado la diferencia de eficacia del tPA iv en función de la causa del ictus; de forma que los ictus aterotrombóticos tienen menor porcentaje de recanalización⁵⁴.

Sexo: en algunos estudios apuntan que los varones recanalizan menos⁵⁵.

Antecedente de DM: el antecedente de DM es otro de los factores que podría disminuir la probabilidad de recanalización arterial³⁷.

Fármacos previos:(1) Antidiabéticos orales: en pacientes que previamente están en tratamiento con Biguanidas los trombos podrían lisarse más rápido, pudiendo interferir en la activación de la trombina, y disminuir la actividad del factor XIII, dando lugar a fibras más delgadas y con poros más estrechos. En el caso de la Glicazida (perteneciente al grupo de las sulfonilureas), actuarían sobre la red de fibrina del trombo haciéndole igualmente más susceptible a la fibrinolisis⁵⁶. (2) Estatinas: reducen la formación de trombina e inhiben el factor XIII⁵⁷. (3) Ácido acetil salicílico: aumenta la permeabilidad de la fibrina del trombo^{58, 59}. (4) Warfarina: es un fármaco que puede afectar a la composición del trombo⁶⁰.

Inhibidores endógenos de la fibrinolisis: niveles altos de PAI-1 se han asociado a una menor probabilidad de recanalización arterial precoz tras tratamiento trombolítico en los pacientes con ictus agudo por oclusión de la arteria cerebral media⁴².

Además, incluso en pacientes con recanalización arterial precoz, se han determinado otros factores que pueden influir en el pronóstico funcional adverso, como son las complicaciones derivadas del tratamiento de

reperusión, la gravedad inicial del ictus, la presencia de amplios signos precoces de isquemia en el estudio radiológico inicial, la hiperglucemia o las cifras de TA excesivamente elevadas o disminuidas durante el tratamiento⁶¹⁻⁶³.

En este sentido el SM y la resistencia a la insulina pueden contribuir a agravar el problema clínico existente en el momento actual de la resistencia a la recanalización arterial en los pacientes con ictus que reciben tratamiento con terapias de reperusión iv, o bien influir en el pronóstico de los pacientes con ictus independientemente de la recanalización arterial. Algunos de los factores relacionados con la resistencia a la insulina que podrían reducir el potencial beneficio del tPA, serían la presencia de un estado pro-inflamatorio (la inflamación crónica se ha relacionado con una mayor mortalidad tras el ictus isquémico tratado con tPA⁴²) y la disfunción endotelial que conduce a cambios en pared vascular que podrían interferir en la recanalización arterial y agravar el daño cerebral post-isquémico⁶⁴. A pesar de todo ello, hasta el momento actual no se ha podido demostrar un efecto sobre la resistencia a la recanalización arterial.

1.2 SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA

1.2.1 CONCEPTO DE SÍNDROME METABÓLICO. HISTORIA Y DEFINICIÓN ACTUAL

El SM se caracteriza por la presencia simultánea o secuencial de algunas de las siguientes alteraciones: resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora, tolerancia anómala a la glucosa o intolerancia hidrocarbonada o DM tipo 2, dislipemia aterogénica (incremento de TG plasmáticos, colesterol VLDL, partículas pequeñas de LDL y/o disminución de HDL), obesidad central o visceral, HTA, hiperuricemia, alteraciones hemorreológicas y de la fibrinólisis, disfunción endotelial y elevación de marcadores inflamatorios como la PCR.

Sin embargo, actualmente no se dispone de una definición universalmente aceptada para el SM, y ha recibido sinónimos como: síndrome plurimetabólico, dismetabólico, de Reaven o síndrome X, o cuarteto mortífero.

Remontándonos a la década de los 20 del siglo pasado, encontramos las primeras descripciones de la asociación existente entre distintas entidades clínicas como la HTA, DM y dislipemia. En 1988, Reaven en su conferencia de Banting, introdujo por primera vez el término Síndrome X, para referirse a aquellos individuos en los que tendían a ocurrir una serie de factores⁶⁵:

- Resistencia a la captación de glucosa mediada por insulina

- Intolerancia a la glucosa
- Hiperinsulinemia
- Aumento de TG y de las VLDL
- Disminución del colesterol HDL
- HTA

En el esfuerzo por introducir el SM en la práctica clínica, diferentes grupos de trabajo en la comunidad científica internacional, han propuesto una serie de criterios cuali y cuantitativos; los cuales responden a dos aproximaciones diagnósticas diferentes⁶⁶: (1) La primera enfocada en la patogénesis del SM, considerando la resistencia a la insulina como el mecanismo fisiopatológico común que puede conducir a la concurrencia de los diferentes factores de riesgo metabólicos mencionados; (2) El segundo enfoque de la definición obedecería a un concepto más práctico desde el punto de vista clínico, con el propósito de identificar aquellos individuos más susceptibles a desarrollar enfermedad vascular aterosclerótica.

Condición	Organización Mundial de la Salud (OMS 1998)	Grupo Americano Adult Pannel Treatment III (ATPIII 2001)	Organización Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR, 2002)	Asociación Americana de Endocrinólogos (AAEE 2003)	Fundación Internacional de Diabetes (IDF 2005)	American Heart Association (AHA 2005)
Resistencia Insulina	Intolerancia a glucosa, Alteración glucosa en ayunas, baja sensibilidad a la insulina más 2 de:	Ninguna, pero 3 de los siguientes:	Insulina en plasma > 200 µU/ml, más 2 de:	Intolerancia a glucosa, Alteración glucosa en ayunas, más uno de:	Ninguno	Ninguno, pero 3 de los siguientes:

Obesidad central	Hombre: ratio cintura-cadera >0.90; Mujer: ratio cintura-cadera >0.85 y/o IMC >30kg/m ²	Cintura abdominal \geq 102cm hombres y \geq 88 en mujeres	Cintura abdominal \geq 94cm hombres y \geq 80 en mujeres	IMC \geq 25kg/m ²	Aumento de cintura abdominal (dependiendo de la población) más 2 de:	Cintura abdominal \geq 102cm hombres y \geq 88 en mujeres (según la población)
Dislipemia aterogénica	TG \geq 150mg/dl y/o HDL <35mg/dL hombres y en mujeres <39mg/dL	TG \geq 150mg/dl y/o HDL <40mg/dL hombres y en mujeres <50 mg/dL	TG \geq 150mg/dl y/o HDL <39mg/dL hombres y mujeres	TG \geq 150mg/dl y/o HDL <40mg/dL hombres y en mujeres <50 mg/dL	TG \geq 150mg/dl y/o HDL <40mg/dL hombres y en mujeres <50 mg/dL o en tratamiento	TG \geq 150mg/dl y/o HDL <40mg/dL hombres y en mujeres <50 mg/dL o en tratamiento
HTA	\geq 140/90 mmhg	\geq 130/85 mmhg	\geq 140/90 mmhg o en tratamiento	\geq 130/85 mmhg	\geq 130/85 mmhg o en tratamiento	\geq 130/85 mmhg o en tratamiento
Hiper glucemia	Intolerancia a glucosa, Alteración glucosa en ayunas o DM tipo 2	>110mg/dl (incluido DM)	Intolerancia a glucosa, Alteración glucosa en ayunas pero no DM tipo 2	Intolerancia a glucosa, Alteración glucosa en ayunas pero no DM tipo 2	>100mg/dl (incluido DM)	>100mg/dl o en tratamiento
Otros	Micro-albuminuria			Otras características de resistencia a la insulina		

Tabla 1: Criterios diagnósticos del SM. OMS: Organización Mundial de la Salud⁶⁷; ATPIII: Grupo Americano Adult Panel Treatment III⁶⁸; EGIR: European Group for study of Insulin Resistance⁶⁹; AACE: American Association of Clinical Endocrinologist⁶⁹; IDF: International Diabetes Foundation⁷⁰; AHA: American Heart Association⁷¹. Tabla modificada y traducida de Arenillas JF et al; Stroke 2007⁶⁶.

De las definiciones más en uso de la tabla anterior, que fueron las primeras descritas, OMS⁶⁷, EGIR⁶⁹, ATPIII⁶⁸, la propuesta por el grupo

americano ATPIII difiere de las otras dos (OMS / EGIR) por no incluir el binomio resistencia a la insulina/hiperinsulinemia, y además destacar la posición central de la obesidad visceral entre los demás criterios. La AACE ha establecido unos nuevos criterios que podrían considerarse una combinación entre los criterios de las organizaciones ATP III y OMS. La IDF considera por primera vez como requisito, la presencia de obesidad central, y utilizando como medida antropométrica principal el perímetro de cintura, sencillo de medir en la práctica clínica.

La diversidad de estos criterios, no homologables en todas las poblaciones, ha motivado una crítica severa del propio concepto de SM e incluso cuestionando la idoneidad de su inclusión en la terminología de la práctica clínica⁶⁹. Por este motivo en los últimos años, se ha publicado una definición consensuada y unificada por los diferentes grupos (OMS, IDF, AHA, International Atherosclerosis Society e International Association for the Study of Obesity), que contempla la presencia de tres o más de los siguientes cinco criterios⁷²:

- Aumento de la cintura abdominal (con un punto de corte en función del país y del grupo étnico).
- Elevación de los TG o en tratamiento por hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dl o 1.7mmol/L)
- Disminución del colesterol HDL o en tratamiento por disminución del mismo (< 40 mg/dl o 1.0mmol/L en varones; < 50 mg/dl o 1.3mmol/L en mujeres)
- Elevación de la presión arterial o en tratamiento antihipertensivo (TAS ≥ 130 o TAD ≥ 85 mmHg)

- Glucemia basal elevada o en tratamiento por hiperglicemia (≥ 100 mg/dl).

1.2.2 CONCEPTO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se define, según el Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes, 2002, como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. Es el rasgo común de diversas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DM tipo 2, la obesidad, la HTA, las dislipemias o la enfermedad cardiovascular. La resistencia a la insulina se puede considerar el componente esencial del SM, pero ambos términos no son equivalentes. El SM es un término descriptivo de una situación clínica de riesgo cardiovascular; mientras que la resistencia a la insulina se refiere a un mecanismo fisiopatológico.

Estudios previos han reportado, que una elevada proporción de pacientes con SM tienen resistencia a la insulina⁷³. Sin embargo existe diferencia de opiniones respecto al papel de la resistencia a la insulina en el SM. Primero, la definición establecida por la OMS, EGIR, AACE, y por la IDF, reportadas en el apartado anterior, defienden el prominente papel de la resistencia a la insulina como el mecanismo fisiopatológico subyacente del SM y consideran la resistencia a la insulina como la única alteración fisiológica que puede conducir al desarrollo de todas las alteraciones metabólicas que componen el SM. Segundo, las definiciones publicadas por

ATP III y AHA, consideran los cinco criterios diagnósticos descritos en el apartado de definición de SM, como iguales^{74, 75}.

A pesar de esta aparente confusión, existe una actual tendencia a dirigir el tratamiento de la DM tipo 2 y la enfermedad cardiovascular, sobre la resistencia a la insulina⁷⁶. Teniendo en cuenta este concepto, la más reciente definición de SM, de la IDF en 2005, ha disminuido a 100mg/dl el valor de corte para la definición de SM, el cual es el criterio con mayor valor predictivo positivo para detectar la resistencia a la insulina.

1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia del SM y de la resistencia a la insulina en la población varía ampliamente en función de la definición empleada, así como de otras variables tales como el grupo étnico, el sexo y la edad de la población estudiada. Como ha sido descrito en apartados anteriores, la inexistencia de una definición universal para el SM dificulta la estimación precisa de su prevalencia.

En Estados Unidos, un estudio desarrollado en 89 localidades, el estudio NHANES III⁷⁷, que empleaba criterios ATP III, mostró una prevalencia global de SM del 22,8% en el grupo de los varones y del 22,6% en las mujeres. Considerando el grupo étnico y el sexo de la población de estudio, la prevalencia fue del 13,9%, 20,8% y 24,3% para varones afro-americanos, mejicanos-americanos y blancos respectivamente. En el caso de las mujeres las prevalencias fueron del 20,9%, 22,9% y 27,2% para la población afro-americana, blanca y mejicana-americana respectivamente. Estos resultados

favorables a la población afro-americana, podrían explicarse por la aplicación de los criterios ATP III, en los cuales ambos criterios lipídicos están separados, limitando el efecto de las mayores tasas de HTA y resistencia a la insulina entre los afro-americanos⁷⁸. En este estudio se observó así mismo un claro incremento de la prevalencia del SM con el aumento de la edad.

En Europa, la prevalencia global del SM obtenida aplicando los criterios de la OMS, pero excluyendo diabéticos se sitúa en el 23% (con límites entre el 7 y el 33% según la edad) en la población masculina y el 12% (con límites entre el 5 y el 22% para edades entre 40 y 55 años) en la femenina. Aplicando la definición EGIR⁷⁹ también en individuos no diabéticos, se obtiene una menor prevalencia global del SM en Europa, siendo del 16% en varones y del 9,7% en mujeres.

En España, el estudio VIVA, incluido en las estimaciones europeas del EGIR y de carácter multicéntrico, también ha descrito una mayor prevalencia global del SM cuando se aplican los criterios de la OMS, habiendo detectado una prevalencia del 19,6% en mujeres y del 25,3% en varones según criterios OMS, y del 14,5 % y el 15,6% respectivamente, según criterios EGIR.

Respecto a la presencia de otros factores que pueden influir en la variación de la prevalencia del SM, la edad se ha convertido en un factor crítico y en un instrumento esencial de predicción para el potencial desarrollo del SM. En otros estudios realizados tanto en población americana⁸⁰, como en población europea⁸¹ también encuentran que la prevalencia del SM aumenta con la edad en ambos sexos, especialmente a partir de los sesenta años de edad. También se observa que en mujeres con edad premenopáusica, la prevalencia del SM es menor que en el grupo de varones con edades equivalentes, pero tras la menopausia esta prevalencia aumenta

alcanzando valores comparables a los de los hombres hacia los setenta años⁸².

Respecto a las diferencias observadas en cuanto a la prevalencia de SM en función del grupo étnico estudiado, aunque no se conocen las causas de estas diferencias étnicas, con los datos disponibles se sospecha que puedan deberse a la interacción genes / ambiente. Esta teoría es apoyada por los resultados de un estudio realizado en EEUU en individuos de raza blanca (n = 5581), negra (n = 3305) y mejicanos (n = 3477), que mostraba diferente prevalencia en cada etnia: 17,4% en la población raza negra, 24% en la población mejicana y 23,6% en la población de raza blanca; esta diferencia se mantenía después de realizar el ajuste por distintas variables relevantes tales como la edad, IMC, consumo de alcohol y tabaco, nivel socioeconómico y grado de actividad física⁷⁷.

Todos estos datos mostrados en los estudios descritos, ponen en evidencia que el SM y la resistencia a la insulina se están convirtiendo en unos de los mayores problemas de salud existentes en el momento actual⁸³. Los continuos cambios en el estilo de vida y en el ambiente, están contribuyendo a que el SM y la resistencia a la insulina alcancen dimensiones de epidemia. Se podría afirmar que una de las fuerzas motrices del SM y la resistencia a la insulina es la creciente incidencia de la obesidad en el mundo, constituyendo la enfermedad metabólica más prevalente del mundo occidental.

El estudio WHO MONICA⁸⁴, realizado entre 1983 y 1986, aportó datos comparativos de la prevalencia de la obesidad en distintos países europeos siendo la prevalencia en España de grado medio en relación a la de otros países europeos. Respecto a la tendencia actual, el análisis de los datos de la

Encuesta Nacional de Salud de 1987 y 1997⁸⁵, apuntan a un aumento de la obesidad en hombres entre 55 y 64 años y mujeres de 65 años, así como en personas con menor nivel educativo. La SEEDO promovió la realización del estudio SEEDO'2000⁸⁶, que incluyó datos de distintas Comunidades Autónomas estimando una prevalencia de obesidad en España de 14.5% para la población de entre 25-60 años (15.7% en mujeres; 13.3% en hombres). El 39% de la población adulta se incluye en el grupo de sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) siendo un 45% varones y un 32% mujeres entre 25 y 60 años. Analizando la influencia de los factores ambientales sobre la distribución ponderal, se observó un aumento de la obesidad en la población con nivel sociocultural bajo y en el medio rural. También se relacionó con la edad, independientemente del sexo.

1.2.4 FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME METABÓLICO Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA

1.2.4.1 ACCIONES DE LA INSULINA Y MECANISMOS MOLECULARES

La insulina, principal hormona anabólica y anticatabólica, es sintetizada por las células β del páncreas y secretada a la sangre para posteriormente unirse a su receptor (situado en la superficie celular) presente en los principales tejidos diana: hígado, músculo y tejido adiposo⁸⁷.

En los tres órganos diana facilita la captación de AGNE para estimular la síntesis de TG. En el músculo esquelético, estimula la captación de glucosa para la síntesis de glucógeno, y de aminoácidos para la síntesis proteica.

Sobre el tejido adiposo, la insulina ejerce dos acciones fundamentales: (1) Adipogénesis, favoreciendo la síntesis de TG; (2) Acción antilipolítica, disminuyendo la liberación de AGNE desde el tejido adiposo a la circulación sanguínea. A nivel hepático, la principal función de la insulina es suprimir la producción de glucosa hepática, inhibiendo la gluconeogénesis y la degradación del glucógeno (figura 2).

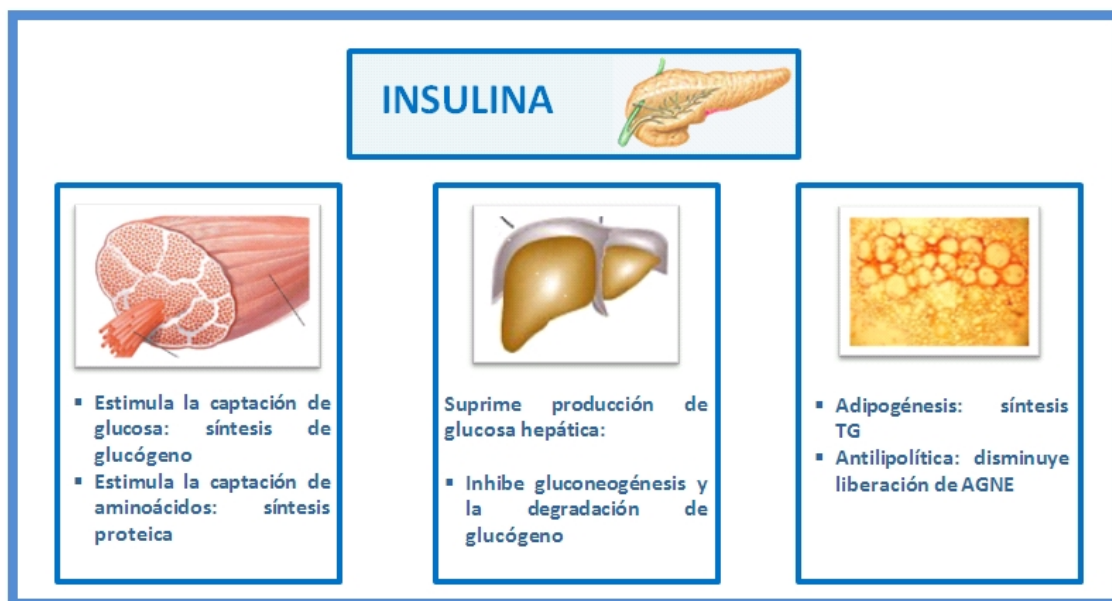


Figura 2. Esquema de las principales acciones de la insulina.

La insulina ejerce un papel primordial en la homeostasis de la glucosa a través de un control neuroendocrino y metabólico; de manera que cualquier oscilación en los niveles de glucemia se acompaña de la variación apropiada en la concentración de insulina en sangre. Aumenta de manera muy rápida el transporte de glucosa como consecuencia del rápido incremento de las proteínas glucotransportadoras GLUT4 en la superficie de células musculares y de adipocitos. Existe una relación lineal entre la

concentración de insulina en el líquido intersticial y la utilización de glucosa en el tejido muscular esquelético, debido a que la insulina presente en el líquido intersticial es la que se une al receptor específico en las células musculares. Este proceso de llegada de la insulina a las fibras musculares esqueléticas está controlado por la actividad de las células endoteliales de los capilares, porque la insulina aumenta el flujo sanguíneo en el músculo esquelético a través de la liberación de óxido nítrico (NO) desde el endotelio vascular.

El receptor de la insulina es una proteína heterotetramérica compuesta por dos subunidades alfa idénticas extracelulares y dos subunidades beta transmembrana también idénticas entre sí y unidas por puentes disulfuro. Las unidades alfa contienen los “sitios” de unión de la insulina. Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Dos vías de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) (figura 3).

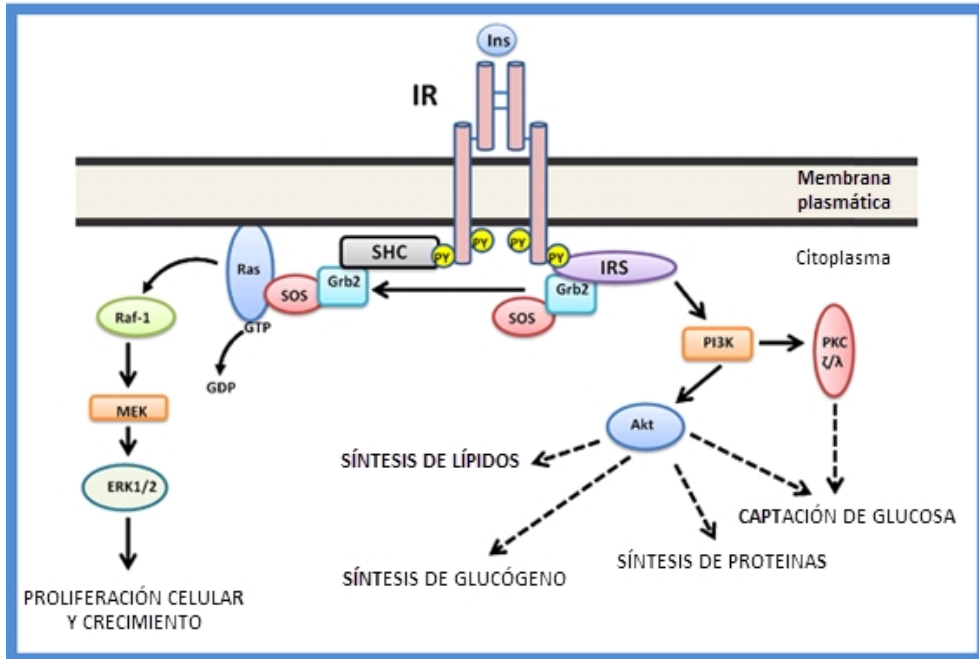


Figura 3: Mecanismos moleculares. Activación de las vías MAP cinasas y fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K). Adaptada y traducida de Olivares-Reyes et al, Mol Cell Endocrinol 2009⁸⁸.

Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, que podrían resumirse en:

- Acción rápida: Transporte de glucosa al interior de las células.
- Acciones intermedias: Síntesis de glucógeno, síntesis proteica, síntesis de AG.
- Acciones tardías: Crecimiento celular, transcripción y expresión génica.

1.2.4.2 MECANISMOS RESPONSABLES DEL DESARROLLO DE RESISTENCIA A LA INSULINA

Son diversos los mecanismos responsables de la resistencia a la insulina; atendiendo al nivel topográfico, se pueden clasificar en:

1. Nivel pre-receptor: antes de la unión de la insulina al receptor.
2. Nivel receptor: en la unión insulina-receptor
3. Nivel post-receptor: después de la unión de la insulina al receptor.

De una forma gráfica estos mecanismos están representados en la figura 4.

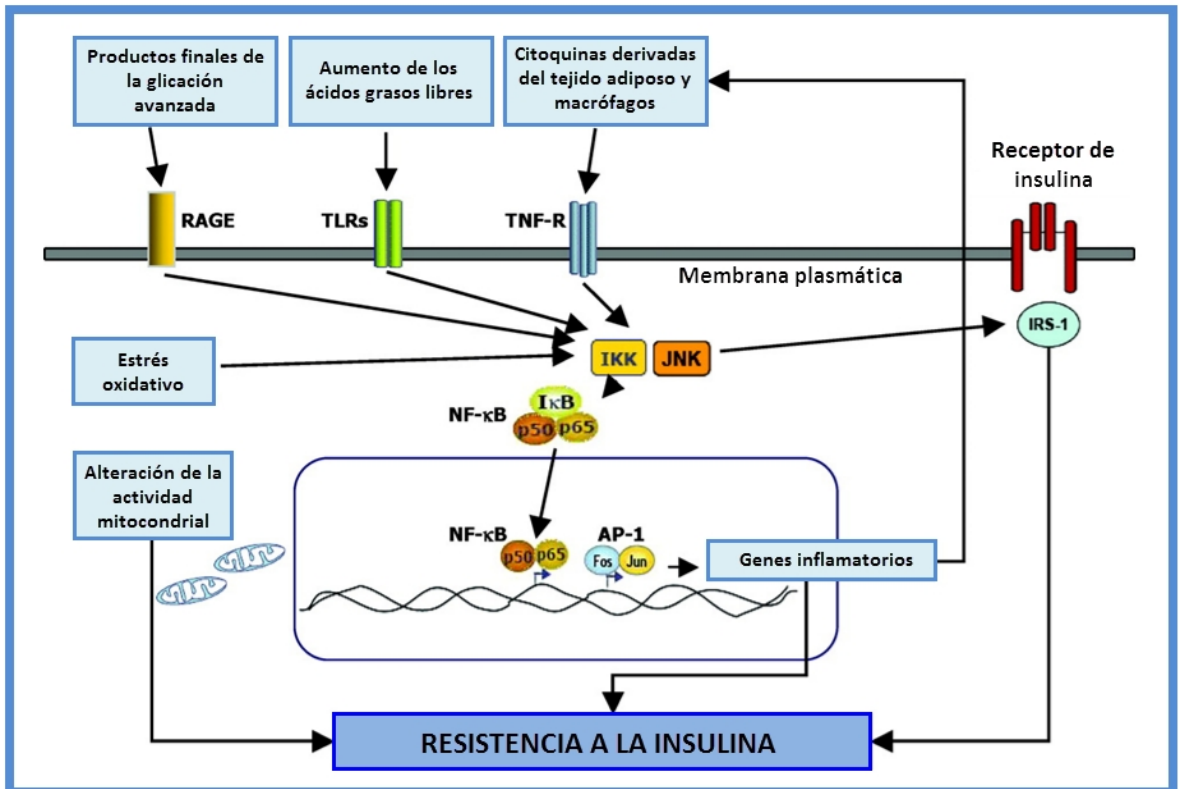


Figura 4: Mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la insulina. Modificada de Arenillas JF et al; Stroke 2007⁶⁶.

El nivel pre-receptor y receptor se pueden deber a la presencia de determinadas moléculas en la sangre que interfieren en el contacto entre la insulina y el receptor (anticuerpos, proteínas neutralizantes).

Las alteraciones en el nivel post-receptor son los más frecuentes, constituyendo el mecanismo fundamental en situaciones tales como DM tipo 2 o en la obesidad. Este mecanismo se asocia a una o varias de las alteraciones siguientes:

- Alteración en las vías de transmisión de las señales que se generan después de la unión de la insulina al receptor, tales como alteración en la activación de proteínas IRS o de la fosfatidilinositol-3-quinasa⁸⁹.
- Antagonismo en la acción de la insulina por adipocinas derivadas del tejido adiposo. El adipocito es una célula capaz de secretar una serie de moléculas llamadas adipocitocinas que tienen efectos paracrinos y autocrinos, y otras que pueden modular la actividad de otros tejidos sensibles a la insulina (efecto endocrino). El efecto específico de algunas de estas moléculas será expuesto en un apartado posterior.
- Antagonismo por la presencia de AGNE y/o AGL, presente en situaciones de obesidad o DM tipo 2. Los AGL tienen un efecto inactivador o reductor de la activación de proteínas clave en la transmisión de señales post-receptor, como IRS o fosfatidilinositol-3-quinasa.
- Incremento del estrés oxidativo: la disfunción endotelial presente en casos de obesidad o DM tipo 2, puede generar un aumento del estrés oxidativo que a su vez puede conducir a una inhibición de la señalización del receptor de la insulina^{90, 91}.

- Influencia de factor genético: se conocen determinados genes que pueden conferir cierta susceptibilidad individual a la aparición de la resistencia a la insulina. Existe una hipótesis denominada “la hipótesis del genotipo ahorrador”, propuesta por Neel⁹², según la cual la selección genética habría favorecido a aquellos individuos o grupo étnico para lograr una conservación energética óptima para poder sobrevivir en periodo de hambre. Sin embargo, este genotipo en época de abundancia de alimentos, tendría un efecto perjudicial favoreciendo el desarrollo de obesidad, DM o resistencia a la insulina⁹³.
- Aumento de determinadas hormonas contrarreguladoras cuya acción es opuesta a la de la insulina, como las catecolaminas o la hormona del crecimiento^{94, 95}.

Podría por tanto considerarse que en el desarrollo de la resistencia a la insulina están implicados, por un lado distintos polimórficos genéticos y por otro la influencia de factores ambientales entre los que destacaría la obesidad, la edad y el sedentarismo. La obesidad interviene en el proceso de la inflamación^{96, 97} conduciendo a la resistencia a la insulina mediante la activación de serinas quinasas implicadas en la transcripción de factores como I κ Bkinase- β y Jun kinase-1, a Jun kinase isoform^{98, 99}. Estos factores pueden ser activados por múltiples estímulos, bien a través de receptores de membrana específicos como citoquinas proinflamatorias, receptores tipo Toll y receptores de los productos finales de la glucosilación avanzada^{100, 101}; o por procesos en los que no participan receptores como aquellos desencadenados por el estrés oxidativo¹⁰². El aumento de la actividad hepática de la diana I κ Bkinase- β , el factor de transcripción NF-KB, provoca resistencia a la insulina en esteatosis hepática presente en la obesidad, probablemente atribuida al

aumento en la expresión de genes de citoquinas como la IL-6, TNF α , y la IL-1 β ¹⁰³. Actualmente son varias las publicaciones que muestran la relación existente entre la resistencia a la insulina, la obesidad y la DM tipo 2 con una activación de los marcadores del sistema inmunológico y de la inflamación, tanto en las células del sistema inmunológico como en el tejido adiposo^{104, 105}. Así mismo en los últimos años se han desarrollado nuevas teorías sobre la implicación de la activación del sistema inmunológico y la inflamación en la etiopatogenia de la resistencia a la insulina, presentando a la resistencia a la insulina como una estrategia de supervivencia en situaciones de ayuno y especialmente de infección¹⁰⁶. Dentro de estas nuevas teorías, destaca la hipótesis presentada por el grupo del Dr. W. Ricart que propone que la aparición de la resistencia a la insulina podría interpretarse como un hecho adaptativo al conjunto de diferentes presiones evolutivas, principalmente la eficiencia energética, la capacidad de almacenar energía y la lucha contra la infección. Algunos estudios ponen en evidencia como durante la ingesta se produce una importante entrada de patógenos pudiendo desencadenarse una respuesta inflamatoria aguda¹⁰⁷. Las células que participan en la respuesta metabólica (adipocitos) e inmunitaria (macrófagos) tienen una expresión génica similar, existiendo por tanto una conexión entre las vías inflamatorias y metabólicas. Este grupo propone que ante una situación de sobrenutrición, al reactivarse la capacidad del tejido adiposo de inflamarse, se puede producir una respuesta inflamatoria que puede cronificarse, siendo esta inflamación la que a través de distintos mecanismos deterioraría la señal de la insulina.

1.2.4.3 CONSECUENCIAS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

La tabla 2 expone una lista de los principales cambios que pueden ocurrir en los individuos con resistencia a la insulina.

Distintos grados de intolerancia a la glucosa	Alteración de la glucosa en ayunas Alteración en la tolerancia a la glucosa
Alteración en el metabolismo del ácido úrico	Aumento de la concentración de ácido úrico en plasma Disminución del aclaramiento renal de ácido úrico
Dislipidemia	Aumento de TG Disminución de HDL Aumento de LDL Aumento de lipemia postprandial
Hemodinámicas	Aumento de la actividad del Sistema nervioso simpático Aumento de la retención renal de sodio Aumento de la presión arterial
Hemostáticas	Aumento del PAI-1 Aumento del fibrinógeno
Disfunción endotelial	Aumento de la adhesión de células mononucleares Disminución de la vasodilatación dependiente del endotelial
Reproductivas	Síndrome de ovario poliquístico

Tabla 2: Alteraciones descritas en la resistencia a la insulina. Modificada y traducida de Reaven G et al, Circulation 2002⁷⁵.

La clave de la resistencia a la insulina se encuentra en la función, como órgano secretor, del tejido adiposo agrandado e inflamado. Tanto los adipocitos como las células inmunitarias que infiltran el tejido adiposo, pueden modificar la expresión de citoquinas, lo cual conlleva a la situación de resistencia a la insulina, aterogénesis e inflamación. Este estado proinflamatorio quedaría perpetuado por la atracción de más factores quimiotácticos por parte de los macrófagos que infiltran el tejido adiposo, que tienen a su vez la capacidad de atraer a un mayor número de macrófagos y cerrar de este modo un círculo vicioso.

La falta de la acción periférica de la insulina conduce a un aumento de la lipólisis y una disminución del aclaramiento de los AGL, de manera que los lípidos empiezan a acumularse en otros tejidos y aumenta la concentración de AG circulantes. Estos AGL procedentes del tejido adiposo, tienen la capacidad de interferir en los procesos de captación y utilización de la glucosa inducidos por la insulina, en el músculo esquelético, el hígado y en el páncreas^{108, 109}.

A nivel del músculo esquelético, existe una reducción del transportador de la glucosa sensible a la insulina, y por tanto de la captación de glucosa en el mismo, teniendo como consecuencia una disminución del metabolismo no oxidativo de la glucosa y de la síntesis de glucógeno. Todos estos fenómenos ocasionarían un estado severo de hiperglucemia¹¹⁰.

A nivel hepático, la resistencia a la insulina se manifiesta con un aumento de la producción hepática de glucosa, debido a que la insulina no es capaz de bloquear la neoglucogénesis en los periodos postabsortivos¹¹¹. Además, el exceso de AG causa un aumento en la producción de las partículas VLDL, que da lugar a la presencia de dislipemia aterogénica que

caracteriza a este síndrome con la elevación de los TG, una disminución del colesterol HDL, que es la molécula que devuelve el colesterol al hígado (transporte reverso), y aumento de las partículas de LDL¹¹².

A nivel del páncreas, mientras existe sensibilidad en las células β del mismo, hay hiperinsulinemia, aunque los niveles de glucemia son capaces de mantenerse normales durante años. Como hemos expuesto en la tabla 2, en el síndrome de resistencia a la insulina, existen distintos grados de alteración en el metabolismo de la glucosa, de manera que en unas primeras fases, la disminución en la sensibilidad de las células pancreáticas, conlleva un aumento en la secreción de insulina, pero cuando el individuo no es capaz de mantener este balance aparece un estado de intolerancia a la glucosa con alteración de las cifras de glucemia basal y postprandial¹¹³. El siguiente paso sería el desarrollo de DM tipo 2, cuando ya se produce un fracaso relativo de la función endocrina de las células β , lo cual está facilitado por la glucotoxicidad y por la presencia de AG circulantes¹⁰⁹.

Respecto a la presencia de las alteraciones hemodinámicas, que caracterizan al estado de resistencia a la insulina, se sabe que la insulina tiene efectos presores mediante la estimulación del sistema nervioso simpático. Así mismo facilita la absorción renal de sodio, produciendo un incremento en la sensibilidad de la presión arterial al sodio de la dieta, aumentando la respuesta a la Angiotensina II y facilitando la acumulación de calcio intracelular¹¹⁴. Algunas de las moléculas secretadas por el tejido adiposo alterado por la obesidad, son capaces de actuar, bien de una forma directa¹¹⁵ o bien al generar un estado pro-inflamatorio crónico¹¹⁶, sobre el desarrollo de la HTA. Además en la insulinoresistencia existe un deterioro de la función endotelial, que es capaz de alterar el tono endotelial hacia una vasoconstricción, contribuyendo este fenómeno al desarrollo de la HTA¹¹⁶.

De una forma más gráfica, podríamos representar todos estos cambios que acontecen en los individuos con resistencia a la insulina en la siguiente figura (figura 5).

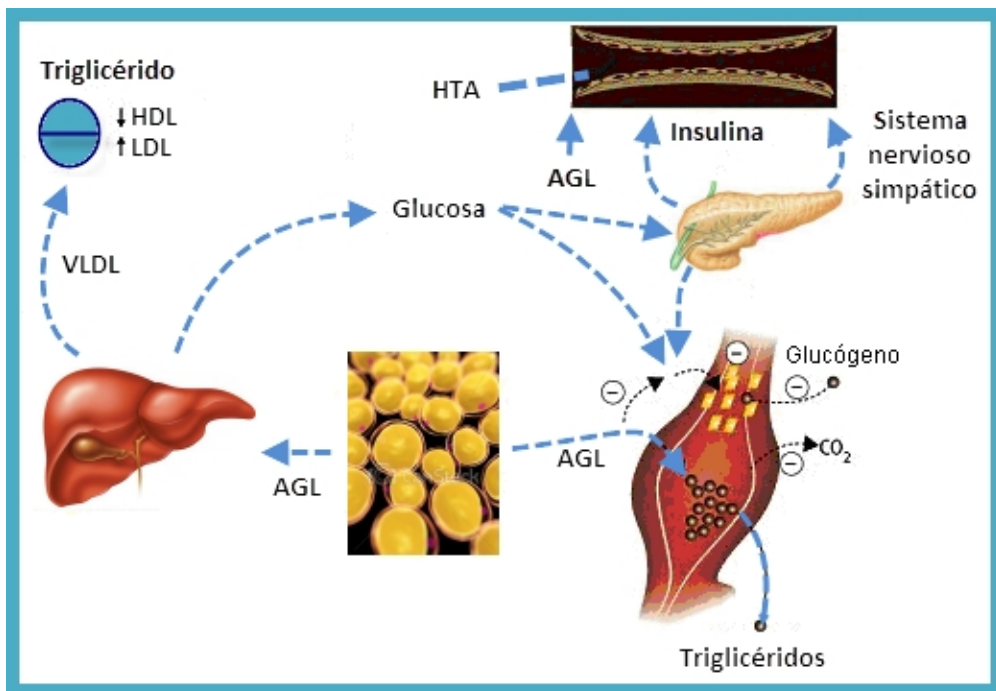


Figura 5: Esquema de alteraciones presentes en situaciones de resistencia a la insulina.

Volviendo sobre la tabla 2, vemos además algunas consecuencias de la resistencia a la insulina más específicas respecto a las alteraciones de la hemostasia y la disfunción endotelial, que explicaremos de forma mucho más detenida en el último apartado de la introducción, acerca de ictus y SM.

1.2.4.4 MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Como ya hemos comentado, en el estado de resistencia a la insulina, está presente la activación de un estado proinflamatorio, inducido por la obesidad¹¹⁷. La alteración en la secreción de una serie de factores derivados del tejido adiposo en individuos obesos participa en el estado inflamatorio crónico asociado a la obesidad. Estos factores incluyen adipocinas como la leptina, adiponectina, resistina o visfatina, así como también quimiocinas clásicas y citoquinas como TNF α ¹¹⁸. Algunos de estos factores derivan no solo de los adipocitos, sino también de los macrófagos, mostrando la estrecha relación existente entre el SM y la respuesta inmunitaria. La activación de la respuesta inmunitaria innata a través de los receptores tipo Toll (TLR), causada por el aumento de los niveles nutricionales de AG, también conducen a la inflamación. En este contexto, los animales con deficiencias en el TLR-4 están parcialmente protegidos contra el desarrollo de resistencia a la insulina por elevada ingesta de AG, posiblemente debido a la disminución de la expresión de genes inflamatorios en el hígado y en la grasa¹¹⁹.

En conjunto, estos reactantes y citoquinas segregadas por el tejido adiposo tienen un papel muy importante en la fisiopatología del SM, siendo responsables del incremento de los problemas vasculares, actuando sobre la señalización de la insulina, fibrinólisis y adhesión celular al endotelio.

Desde la identificación a mediados de la década de los noventa de las primeras adipocinas, leptina¹²⁰ y adiponectina¹²¹, se ha producido un rápido avance en el conocimiento de otras moléculas integrantes de la familia. En este apartado nos centraremos en aquellas moléculas que han sido determinadas en el segundo trabajo:

1. Péptido-C:

El péptido-C^{122, 123} también se denomina péptido conector, debido a que es una cadena de aminoácidos que conecta las cadenas A y B de la proinsulina, siendo metabólicamente inactivo. Durante la conversión de proinsulina a insulina, el péptido-C es escindido de las cadenas de la proinsulina, formándose la molécula de insulina.

El péptido-C y la insulina son secretados a la circulación portal en concentraciones equimoleculares (aunque en la circulación periférica el nivel de péptido-C es mayor que el nivel de insulina debido a que su vida media es más larga). Se puede afirmar que las concentraciones de péptido-C son un mejor indicador del funcionamiento de las células beta que la concentración periférica de insulina. Además, las determinaciones de péptido-C no miden insulina exógena, razón por la cual el péptido-C se mide para diferenciar la insulina producida por el cuerpo, de la insulina inyectada en el organismo, y no reacciona de manera cruzada con los anticuerpos anti-insulina, los cuales interfieren con los inmunoensayos para determinar insulina. El péptido-C también puede ser usado para diagnosticar la resistencia a la insulina.

Investigaciones recientes sugieren que el péptido-C tiene propiedades terapéuticas ya que puede jugar un papel en la prevención o atenuación de algunas de las complicaciones vasculares y neurológicas de la DM.

2. Grelina:

La grelina es un péptido de 28 aminoácidos, y es sintetizada fundamentalmente por el estómago. Se definió como el ligando natural del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento. Su nombre proviene de la raíz proto-indo-europea "*ghre*" que significa crecimiento.

Tiene un efecto orexigénico, regulando la ingesta y el peso corporal. Los niveles circulantes de grelina aumentan antes de las comidas y disminuyen tras la ingesta de alimento. Otras de las funciones de esta hormona, incluye la secreción de la hormona GH, un efecto vasoactivo regulando la presión arterial y efecto cardioprotector. Así mismo puede considerarse que tiene un efecto neuronal, modulando la actividad cerebral en áreas que controlan el apetito. Algunos estudios han demostrado que la grelina puede actuar como una señal que favorece el consumo de comida¹²⁴. Estudios en animales han visto que la administración de grelina en roedores da lugar a un aumento del peso corporal y la adiposidad, debido a que esta hormona estimula ciertas neuronas hipotalámicas provocando un aumento del apetito. También ha demostrado tener un efecto antiinflamatorio y antifibrótico en modelos murinos con fibrosis pulmonar inducida.

3. GIP:

El GIP es un miembro de la familia de hormonas secretina¹²⁵. Esta molécula, junto con el GLP1 pertenecen a una clase de moléculas conocidas como incretinas¹²⁶. Es un derivado de una proteína de 153 aminoácidos codificada por el gen GIP. Es sintetizado por las células K que se encuentran en la mucosa del duodeno y en yeyuno del tracto gastrointestinal. Posteriormente es transportado por el torrente sanguíneo hasta unirse a sus receptores que son siete proteínas transmembrana encontradas en las células beta en el páncreas.

La función del GIP es inducir la secreción de insulina, que es estimulada principalmente por la hiperosmolaridad de glucosa en el duodeno¹²⁷, siendo por este motivo la tendencia actual a denominar a esta hormona como péptido insulino-trópico dependiente de la glucosa. Parece

que la cantidad de insulina secretada es mayor cuando la glucosa es administrada oralmente que por vía iv. Así mismo, parece que el GIP tiene un efecto en el metabolismo del AG a través de la estimulación de la actividad de la lipoproteinlipasa en adipocitos.

Algunos estudios demuestran que los individuos con DM tipo 2 no responden al GIP y tienen niveles más bajos de secreción de GIP después de una comida comparado con un no diabético¹²⁸.

4. **GLP1:**

Es una hormona derivada de la transcripción de un gen llamado proglucagón cuya función fisiológica se fundamenta sobre la concentración sanguínea de glucosa. La fuente principal de GLP1 en el organismo son las células L del intestino, las cuales secretan a la hormona como un producto intestinal. La forma biológicamente activa de la hormona GLP1 son GLP1- (7-37) y GLP1- (7-36) NH₂.

Su secreción es dependiente de la presencia de nutrientes (carbohidratos, proteínas y lípidos) en la luz del intestino delgado. Una vez que el GLP1 alcanza la circulación, tiene una vida media de sólo 2 minutos, debido a la rápida degradación por parte de la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)¹²⁹. Es una molécula objeto de múltiples investigaciones, debido a que se plantea como potencial tratamiento en la DM^{130, 131}.

Las principales funciones de esta molécula son: (1) aumentar la secreción de insulina por parte del páncreas de manera dependiente de la glucosa; (2) suprimir la secreción de glucagón del páncreas; (3) incrementar la masa de las células beta y la expresión del gen de la insulina; (4) inhibir la

secreción de ácido estomacal y el vaciamiento gástrico; (5) suprimir la ingesta de alimento por medio de la sensación de saciedad.

5. Glucagón:

Es una hormona peptídica de 29 aminoácidos sintetizada por las células α del páncreas (en lugares denominados islotes de Langerhans), que actúa en el metabolismo del glucógeno. Algunos de los efectos del glucagón podrían resumirse en: (1) Efectos metabólicos: induce catabolismo del glucógeno hepático y el aumento de la gluconeogénesis, con la consiguiente cetogénesis; (2) Efectos cardíacos: tiene un efecto inotrópico y cronotrópico positivo, similar al estímulo beta adrenérgico; (3) Efecto sobre el músculo liso: induce relajación intestinal aguda; (4) Otros efectos: induce aumento de las catecolaminas y la disminución de la liberación de insulina.

6. Leptina:

La leptina es una hormona de 146 aminoácidos producida a partir de un precursor de 167 aminoácidos. Tiene su origen en diversos tejidos, principalmente en el tejido adiposo, aunque también por el hipotálamo, el ovario y la placenta. Fue descubierta en 1944 en el ratón, y posteriormente su gen (gen Ob) se localizó en el cromosoma 7 en el humano.

La síntesis de leptina ocurre principalmente, aunque no de forma excluyente, a nivel del tejido adiposo blanco. Por esta razón, los niveles circulantes de leptina son proporcionales a la cantidad de grasa corporal. La secreción de leptina varía de acuerdo al ritmo circadiano, siendo secretada en forma pulsátil, y modulada por la insulina y otras. Los cambios en el patrón de secreción asociados a la alimentación están más relacionados con la concentración plasmática de insulina que con el peso corporal. Esto se

debe a que la insulina estimula la expresión de la leptina en adipocitos aislados y, por lo tanto, eleva su nivel circulante. La eliminación de la leptina se lleva a cabo principalmente por vía renal.

Esta hormona actúa como un lipostato, de modo que es liberada a la circulación sanguínea cuando la cantidad de grasa almacenada en los adipocitos aumenta; de manera que genera una señal de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y se inhibe el apetito. Así pues la presencia de defectos genéticos que implican la ausencia de leptina determinan, en ratones y humanos, la aparición temprana de obesidad mórbida, que puede ser revertida con la administración de dicha hormona. Los niveles plasmáticos de leptina en humanos muestran una alta correlación con la masa grasa total, incluso después de pérdida ponderal. Los sujetos obesos presentan elevados los niveles de leptina, siendo la producción de leptina por unidad de masa grasa, similar en individuos obesos y normoponderales. Tras la pérdida ponderal, los niveles de leptina, que disminuyen por debajo del valor estimado en función de la masa grasa, pueden indicar al cerebro la suficiencia de los depósitos grasos para la reproducción, el crecimiento, etc. Parece que es ésta la función principal que ha sido descrita para la leptina, sin embargo muchos estudios posteriores a su descubrimiento, han descrito una amplia distribución de sus receptores en tejidos periféricos, mostrando la participación de la leptina en diversas funciones fisiológicas. Estas funciones fisiológicas pueden llevarse a cabo a nivel del sistema nervioso central y en órganos periféricos.

La leptina puede participar en otras acciones tales como la angiogénesis, inmunidad o la reproducción; de manera que:

- Participa en la respuesta inflamatoria a la vez que modifica la función inmune. Estimula la proliferación de células T CD4+ (hematopoyesis y linfopoyesis) y la producción de citoquinas.
- Interviene en la regulación del inicio de la pubertad y en la función de la reproducción¹³².
- Actúa sobre células endoteliales estimulando la angiogénesis y su posible participación en la regulación de la presión arterial. El exceso de leptina producido por una gran masa de tejido adiposo pudiera jugar un papel importante en la génesis de HTA en los obesos a través de la estimulación simpática y los efectos renales.
- Modifica el metabolismo glucídico. En modelos animales con ratones ob/ob el tratamiento con leptina disminuye los niveles de glucosa sin modificar los de insulina y mejora la sensibilidad a la misma, es decir aumenta la captación de glucosa por los tejidos.
- Estimula la lipólisis en el adipocito, provocando una modificación del reparto lipídico en el tejido muscular¹³³.
- Constituye una señal metabólica fundamental que modula la secreción de la hormona del crecimiento.
- Estudios recientes sugieren que concentraciones elevadas de leptina en individuos obesos, aumentan el riesgo de trombosis vascular a través de un efecto en la agregación plaquetaria¹³⁴.

7. **Resistina:**

La resistina es una proteína rica en cisteína secretada por el tejido adiposo de ratones y ratas. En los demás mamíferos, al menos en los

primates, los cerdos y los perros, la resistina es secretada por células inmunes y epiteliales. La resistina también se conoce como CEBPE precursora de la proteína secretora rica en cisterna¹³⁵ encontrada en la zona inflamada 3, o “factor secretor específico de adipocito”. Entre las proteínas sintetizadas y liberadas del tejido adiposo, la resistina es una citoquina cuyo papel fisiológico respecto a su participación en la obesidad y la DM tipo 2 es controvertido.

El nombre de resistina viene dado por la resistencia a la insulina en ratones con insulina inyectada. La resistina fue encontrada para ser producida y liberada del tejido adiposo para realizar funciones endocrinas envueltas en la resistencia a la insulina. La idea primaria proviene de estudios que demuestran que los niveles de resistina en el suero aumentan con la obesidad en numerosos modelos animales y de humanos¹³⁵⁻¹³⁹. Desde estas observaciones, investigación adicional ha relacionado la resistina a otros sistemas fisiológicos como la inflamación y la homeostasis energética, incluida la relación con la resistencia a la insulina¹⁴⁰⁻¹⁴².

La resistina puede ser una conexión en la conocida asociación entre la inflamación y la resistencia a la insulina, habiendo sido reconocida como un elemento que contribuye a dicha resistencia¹⁴³. Este perfil inflamatorio de la resistina se ve reforzado porque se ha descubierto que incrementa los eventos transcripcionales, conduciendo a un incremento de la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias (IL1, la IL6, la IL12 y el TNF α)^{144, 145}. Así mismo, regula la ICAM1, la VCAM1 y la citoquina CCL2, las cuales se ocupan de las vías quimiotácticas implicadas en el reclutamiento de leucocitos para los puntos de infección¹⁴⁶.

Se podría afirmar que la resistina tiene un papel incompletamente definido en la homeostasis energética, debido a que existen estudios con resultados polarmente contradictorios sobre la relación entre la resistina con la obesidad y la DM tipo 2.

Por un lado existe un gran número de evidencias a favor, derivados de estudios que han demostrado una fuerte correlación entre esta molécula y la obesidad, habiendo encontrado que los niveles de resistina sérica aumentan al incrementarse la adiposidad^{136, 142, 147, 148} (principalmente la adiposidad central o tejido adiposo acumulado en la cintura¹³⁹). Así mismo, diversos trabajos han sugerido que existe una correlación positiva entre los niveles de resistina y la resistencia a la insulina^{99, 149-151}. Este descubrimiento fue ampliamente demostrado por estudios que confirman una directa correlación entre los niveles de resistina y los sujetos con DM tipo 2^{135, 147, 152, 153}. La gran cantidad de evidencias que apoyan la teoría que relaciona la resistina con la obesidad y la DM de tipo 2 es amplia y seguramente seguirá creciendo. Sin embargo, esta teoría carece del soporte de la comunidad científica en su totalidad puesto que continúan emergiendo estudios con evidencias contradictorias¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

La mayoría de hallazgos publicados por grupos contrarios a la teoría de la resistina son exactamente opuestos a lo observado por los defensores de la teoría; de tal forma que algunos de ellos encontraron una disminución significativa de concentraciones séricas de resistina con el aumento de adiposidad^{157, 158, 159}, y por tanto su asociación con la DM tipo 2 resulta muy poco probable. También se han presentado datos demostrando que la pérdida de peso coincide con el aumento de la resistina sérica¹⁴⁴. La idea de que la resistina vincula la obesidad con la DM de tipo 2, resulta aún más difícil de demostrar dado que los últimos estudios han confirmado una amplia

expresión de resistina en varios tejidos y no solo en aquellos característicos de la obesidad como los adipocitos.

8. **Visfatina:**

El nombre de esta molécula procede del inglés “visceral fat”, debido a que sus niveles se correlacionaban con el tamaño de los depósitos grasos viscerales. Fue en el año 2005 cuando identificaron una nueva adipocina que se expresaba mayoritariamente en la grasa visceral tanto de roedores como en humanos¹⁶⁰. Aparte de en el tejido adiposo visceral, la visfatina es producida también por la médula espinal, el hígado y el músculo esquelético, donde está implicada en una gran variedad de funciones^{161, 162}. Tiene un papel importante en el control de la adiposidad¹⁶⁰, teniendo una posible implicación en el desarrollo y la diferenciación de los adipocitos. Modelos animales sugieren que la visfatina podría jugar un papel en el desarrollo de obesidad e insulinoresistencia¹⁶⁰. Algunos de ellos han mostrado como una alimentación rica en grasas en roedores conducía a una elevación de los niveles de visfatina plasmática, acompañada de incrementos del ARNm de la misma en grasa mesentérica (visceral). Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto cierta controversia sobre el papel de la visfatina en la obesidad y la resistencia a la insulina. Así Klötting et al¹⁶³ no encontraron cambios significativos en la expresión del gen de la visfatina en adipocitos del tejido adiposo subcutáneo y epididimal en un modelo poligénico de SM en ratas.

Respecto al papel de la visfatina en la obesidad en humanos, los resultados de los estudios resultan igualmente contradictorios. Así mientras algunos trabajos apoyan una correlación positiva de los niveles plasmáticos de visfatina con la obesidad visceral^{160, 164-166}, otros no apoyan esta

asociación^{167, 168}. Incluso algunos estudios en humanos han llegado a asociar de forma inversa los niveles circulantes de visfatina y el desarrollo de obesidad^{169, 170}.

Diversos trabajos han demostrado la capacidad de la visfatina de inducir la producción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-1B e IL-6 en monolitos CD14+¹⁷¹, que se sabe contribuyen a disminuir la sensibilidad a la insulina. Sin embargo el papel que juegan el TNF- α , la IL-6 y otras citocinas proinflamatorias en la producción de visfatina es también controvertido.

Otro de los aspectos cuestionados de las acciones de la visfatina ha sido la demostración de las propiedades insulina-miméticas descritas en distintos tipos celulares y en modelos animales¹⁶⁰. Sin embargo estos resultados están en entredicho porque no han sido corroborados por otros investigadores.

9. IL6:

La IL6 es una glucoproteína segregada por las células T, células endoteliales y fibroblastos; aunque su principal fuente se considera los macrófagos que infiltran el tejido adiposo.

Es un importante mediador de respuesta inflamatoria. Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas, modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, en especial fibrinógeno. Es el principal estímulo para la síntesis de reactantes de fase aguda (PCR) en personas obesas sanas¹⁷². La IL6 parece relacionada con la dislipemia, la alteración hidrocarbonada y la HTA, que son

típicas del síndrome de resistencia a la insulina¹⁷³, de forma que las concentraciones elevadas de IL6 se relacionan con la resistencia a la insulina^{174, 175}.

10. TNF α :

Es una hormona glucopéptida formada por 185 aminoácidos, que pertenece al grupo de las citocinas liberadas por las células del sistema inmunitario que intervienen en la inflamación.

El TNF α está relacionado con los glóbulos blancos de la sangre, el endotelio y otros tejidos en el transcurso de distintas agresiones celulares. Ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores pro-inflamatorios (IL 1 a la 6) o la inhibición de citoquinas anti-inflamatorias¹⁷⁶. En el hipotálamo actúa sobre el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, estimulando la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH). En el hígado estimula la reacción inflamatoria aguda, activando la síntesis de PCR y otros mediadores celulares. En otros órganos aumenta la resistencia a la insulina; inhibe la autofosforilación de los residuos de tirosina de la subunidad beta del receptor de la insulina^{177, 178}. La liberación de TNF α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetarias, y probablemente la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre.

1.2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE RESISTENCIA A LA INSULINA

Son varios los métodos que sirven en la actualidad para determinar la resistencia a la insulina, combinando distinto grado de precisión y complejidad.

En la tabla 3 se expone una posible clasificación en función de que las técnicas analíticas sean a partir de datos basales o tras estimulación, y en el caso de las últimas, según sea el estímulo oral o iv.

Basados en datos basales	Insulinemia basal Cociente glicemia/insulinemia basal Modelo homeostático-HOMA Otros índices: FIRI, QUICKI, ISI
Basados en estímulo oral (TTOG)	Insulinemia estimulada Otros índices: Belfiore, Cederholm, Matsuda
Basados en estímulos iv	Técnicas de clamp <ul style="list-style-type: none"> – Euglucémico hiperinsulinémico – Hiperglucémico Minimal Model Modelo homeostático-CIGMA Test de tolerancia a la insulina

Tabla 3: Técnicas para la determinación de la resistencia a la insulina.

De todos los métodos mencionados, en la actualidad no se puede hacer una recomendación en cuanto al mejor método disponible, ya que todos presentan distintas ventajas e inconvenientes^{179, 180}.

El “gold standar” es el clamp euglucémico¹⁸¹, y por tanto la validación de las diferentes técnicas se realiza de acuerdo a su comparación con dicha técnica, de manera que una técnica se considera tanto mejor cuanto más estrechamente se correlacionen sus resultados con los del clamp¹⁷⁹.

En el caso de estudios con pocos individuos en los que la precisión es muy importante, lo más adecuado serían las técnicas de clamp o en su defecto el “Minimal Model” o el CIGMA; sin embargo en caso de estudios epidemiológicos con una muestra amplia de individuos, lo más adecuado y práctico es la utilización de algún método a partir de datos basales, como el HOMA o incluso la insulinemia basal, aunque esta última es de menos utilidad si se incluyen pacientes con intolerancia a la glucosa o DM. En concreto en lo referente al índice de HOMA, estudios previos han puesto de manifiesto que sus resultados guardan una buena correlación con los del clamp, tanto en pacientes normotolerantes, como en diabéticos tipo 2¹⁸²⁻¹⁸⁶. Se trata de un complejo modelo matemático que permite que a partir de una muestra simultánea para glucosa e insulina plasmáticas se puedan estimar la resistencia a la insulina y la capacidad secretora del individuo. De este concepto se deriva una de las principales ventajas de este método, que es su sencillez (una extracción sanguínea basal). Además, para calcular el índice de resistencia se pueden utilizar fórmulas relativamente sencillas derivadas de la original más compleja (p.ej. $\text{insulinemia (mU/mL)} \times \text{glicemia (mmol/L)} / 22,5$)¹⁸⁵.

Los otros índices basales o los obtenidos tras un estímulo oral han sido poco utilizados en general y su validez no está consolidada por el momento.

1.3 ICTUS, SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA

1.3.1 FACTOR DE RIESGO DE ICTUS

En relación a la asociación entre resistencia a la insulina y la presencia de factores de riesgo vascular, los datos epidemiológicos disponibles sugieren que la resistencia a la insulina es un factor de riesgo para la enfermedad vascular, incluida la enfermedad vascular cerebral, cardíaca, aórtica y arterial periférica. En términos generales, en un estudio transversal de base poblacional en Holanda, sobre 1.117 individuos, con rango de edad entre 18 y 80 años, en el que definieron el SM según los criterios de ATP III, se encontró una prevalencia del SM de 46%: 58% en pacientes con enfermedad arterial periférica, 41% en cardiopatía isquémica, 43% en enfermedad cerebrovascular y 47% en sujetos con aneurisma de aorta abdominal¹⁸⁷.

En concreto, en la patología cerebrovascular, diversos estudios han reportado la elevada prevalencia del SM en los pacientes con ictus; así resultan interesantes los resultados aportados por National Health and Nutrition Examination Survey entre 10357 sujetos¹⁸⁸, en los que la prevalencia de SM fue significativamente mayor en personas con historia de ictus (43.5%) frente a sujetos con ausencia de historia vascular (22.8%). El SM se asoció de forma independiente con historia de ictus en ambos sexos y en

todos los grupos étnicos (OR 2.16; 95% CI, 1.48-3.16). La asociación entre ictus y SM se ha confirmado también en población de sujetos más ancianos, siendo la frecuencia de SM significativamente mayor en sujetos con historia de ictus isquémico ATH¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Esta asociación soporta la idea del uso clínico de SM para identificar sujetos con un mayor riesgo de tener un ictus; además la hiperinsulinemia como ya hemos comentado, se considera como uno de los probables nexos de unión entre los componentes del SM, y de éstos con la existencia de un mayor riesgo cardiovascular⁶⁵.

Estudios poblacionales de seguimiento a largo plazo de los pacientes han demostrado que en individuos sanos con SM existe un marcado riesgo de eventos cardiovasculares, incluido ictus y mortalidad cardiovascular¹⁹¹. En estudios prospectivos, han reportado una OR ajustada para la incidencia de ictus isquémico asociado al SM entre 2.1 y 2.47, y un hazard ratio de 5.15¹⁹²⁻¹⁹⁵. Esta capacidad predictiva parece independiente de la definición de SM que se emplee, así como del sexo del sujeto estudiado, la edad, o el grupo étnico^{192, 193}. Además esta asociación entre la incidencia de ictus y SM, parece estar aumentada a medida que aumenta el número de componentes del SM^{194, 195}. Otro estudio poblacional publicado más recientemente, el estudio Northern Manhattan⁴², incluyó un total de 3298 individuos que fueron seguidos durante 6.4 años. De ellos un 44% presentaban SM, el cual se asoció de forma independiente con un aumento en el riesgo de ictus con una OR de 1.5 [1.1-2.2].

1.3.2 ATEROESCLEROSIS INTRA-EXTRACRANEAL

El elevado riesgo de eventos cerebrovasculares que hemos descrito en el apartado anterior, podría estar derivado en gran parte por la potencial capacidad del SM de aumentar el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis de las arterias cerebrales¹⁹⁶. En este sentido la resistencia a la insulina representaría un factor crucial en la asociación de SM y aterosclerosis, debido a los múltiples efectos proaterotrombóticos tanto en el sistema fibrinolítico como en el endotelio vascular¹⁹⁷.

Algunos de los mecanismos tóxicos de la resistencia a la insulina y el SM que favorecen la aterosclerosis podrían resumirse en: efecto sobre los lípidos, elevación del PAI-1, incremento del fibrinógeno, disfunción endotelial y aumento del tono vascular^{198, 199}. Estos mecanismos combinados están recogidos de una forma más detallada en la tabla 4.

“A- FLIGHT” toxicidades

HiperAmilinemia/Toxicidad por Amiloide

Angiotensina II

Glicación acelerada/productos de fructosilación

Envejecimiento (del inglés Aging)

Angiogénesis (inducción de estrés reductor)

Arteriogénesis (hiperfunción PAI-1)

Aterosclerosis – Ateroscleropatía

Toxicidad por AGL (del inglés, Free fatty acid)

Lipotoxicidad

Toxicidad por Insulina (hiperinsulinemia/hiperproinsulinemia)

Toxicidad Inflamatoria

Glucotoxicidad y su estrés reductor**Sorbitol****Pseudohipoxia (incremento NADH/NAD)****Toxicidad por HTA****Toxicidad por t-Homocisteína****Toxicidad por TG**

Tabla 4: Mecanismos presentes en el SM y la resistencia a la insulina que favorecen el desarrollo de aterosclerosis. Modificada y traducida de Hayden MR et al, Cardiovasc Diabetol 2003²⁰⁰.

En situaciones de resistencia a la insulina, parece que la acción vasodilatadora de la insulina estaría con frecuencia alterada¹³⁵ en parte debido a una deficiencia en el reclutamiento de capilares por la insulina en tejidos diana típicos (músculo esquelético). La insulina tiene diferentes efectos sobre la vasculatura: por un lado, estimula la actividad de la enzima sintetasa de óxido nítrico del endotelio (eNOS) y la acción vasodilatadora dependiente del endotelio²⁰¹, contribuyendo a la disfunción vasomotora endotelial, abocando no solo a HTA sino también a aterogénesis. Otros efectos de la insulina sobre el árbol vascular son: proliferación de la musculatura vascular lisa, producción de PAI-1 por el hígado²⁰², cambios en la resistencia vascular periférica mediados por neurotransmisores periféricos y centrales²⁰³, incremento del 10 al 15% en el volumen cardiaco de eyección, liberación de catecolaminas y ahorro de Na⁺ y agua por el túbulo renal, a través de la Na⁺-K⁺-ATPasa.

Respecto a la aterosclerosis carotídea, la prevalencia del incremento del espesor del índice íntima-media y de las placas de aterosclerosis en carótidas asintomáticas es mayor en individuos con SM^{204, 205}. La resistencia a

la insulina parece tener un efecto deletéreo sobre la aterosclerosis carotídea, desde la disfunción endotelial hasta el crecimiento de las placas; por tanto aquellas terapias dirigidas a disminuir la resistencia a la insulina podrían reducir la progresión de la ateromatosis carotídea en pacientes con SM y DM tipo 2^{206, 207}.

En relación con la aterosclerosis intracraneal, varios estudios han descrito la relación existente entre SM y aterosclerosis intracraneal^{208, 209}. El SM está presente en la mitad de los pacientes con aterosclerosis intracraneal sintomática; esta cierta propensión de las arterias intracraneales para ser afectadas por el SM, podría reflejar la existencia de una sensibilidad arterial diferente en las distintas topografías, en relación con el estrés oxidativo²¹⁰. La asociación existente entre DM tipo 2 y elevado número de ateroestenosis intracraneal, observada en pacientes europeos-mediterráneos con aterosclerosis intracraneal, sugiere que la resistencia a la insulina podría tener un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad^{211, 212}. De una forma más directa, en otro trabajo más reciente, dirigido por el director de esta tesis, se demostró como la resistencia a la insulina, medida en este caso mediante el índice de HOMA, era un predictor independiente de ateromatosis intracraneal moderada-grave independiente de cada uno de los componentes del síndrome metabólico²¹³.

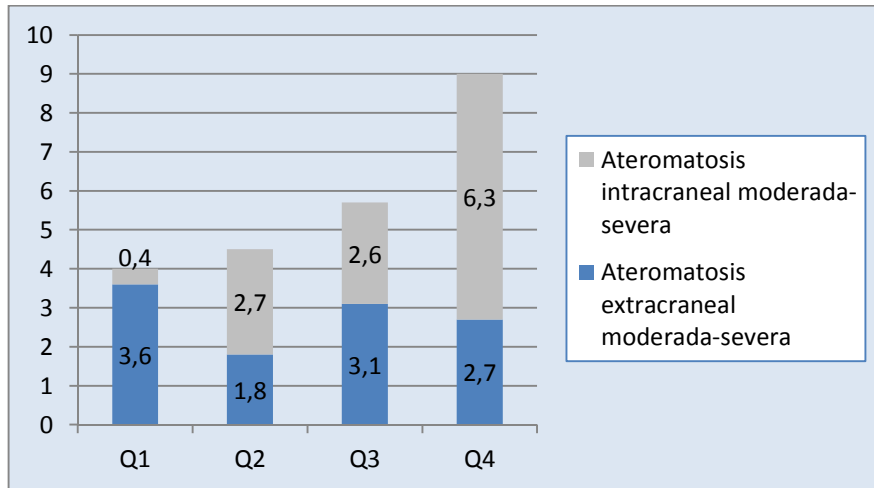


Figura 6. Relación entre la resistencia a la insulina, medida mediante el índice de HOMA (eje de abscisas: “Cuartiles de HOMA”), y la prevalencia de ateromatosis moderada-severa (eje de ordenadas: “% prevalencia de ateromatosis moderada-severa”). Modificada de López-Cancio et al, Stroke 2012²¹³.

Respecto a los biomarcadores de resistencia a la insulina, se han correlacionado los niveles de uno de estos mediadores (la adiponectina) con la gravedad de la ateromatosis intracraneal²¹⁴.

1.3.3 FACTOR PRONÓSTICO DEL ICTUS

La mayor parte de los estudios previos acerca de SM/resistencia a la insulina e ictus, se han centrado, como hemos comentado en el apartado anterior, en el campo de la prevención. Sin embargo las investigaciones sobre el impacto pronóstico del SM y la resistencia a la insulina sobre el ictus isquémico agudo, son más escasas. Por otro lado, algunos de los componentes del SM de forma aislada, sí que han demostrado que empeoran

el pronóstico funcional de los pacientes con ictus. En este sentido, como ya hemos expuesto, alteraciones relacionadas con el SM y la resistencia a la insulina, tales como alteración en el sistema fibrinolítico endógeno, hiperglucemia, la disfunción endotelial, el daño endotelial crónico, o un estado proinflamatorio crónico, podrían contribuir a:

- Amplificar el área de isquemia
- Presentar mayor resistencia a la recanalización arterial

1.3.3.1 SÍNDROME METABÓLICO, RESISTENCIA A LA INSULINA Y ESTADO PROTROMBÓTICO

En la tabla 5 se describen algunas de los mecanismos propuestos en el SM y la resistencia a la insulina que explican las alteraciones de la fibrinólisis y efecto proaterotrombosis presentes en estos pacientes²¹⁵:

Efecto sobre las plaquetas

Disfunción endotelial

Alteración de la hemostasia: aumento en la expresión de PAI-1

Estado proinflamatorio

Dislipemia y acúmulo de grasa en el hígado

Secreción de adipocinas: efecto directo sobre la pared vascular y células circulantes

Tabla 5: Alteraciones presentes en el SM que generan alteración en la fibrinólisis.

Como se expone en la tabla anterior, los pacientes con SM o resistencia a la insulina, tienen un aumento de los inhibidores de la fibrinólisis, como el PAI-1, lo cual reflejaría una alteración en la capacidad fibrinolítica endógena^{216, 217}. Se sabe que el PAI-1 se produce y secreta en el tejido adiposo (principalmente en el abdominal, más que el subcutáneo) regulado por la insulina, de manera que a mayor cantidad de tejido adiposo, mayor cantidad de PAI-1. Además estudios ex-vivo analizando la estructura y función de los trombos, en pacientes con/sin SM, objetivan que aquellos pacientes con SM tienen trombos más densos y tiempos de lisis más prolongados en comparación con aquellos que no tenían SM; estando estos hallazgos también están en relación con el número de componentes del SM²¹⁸ (figura 7).

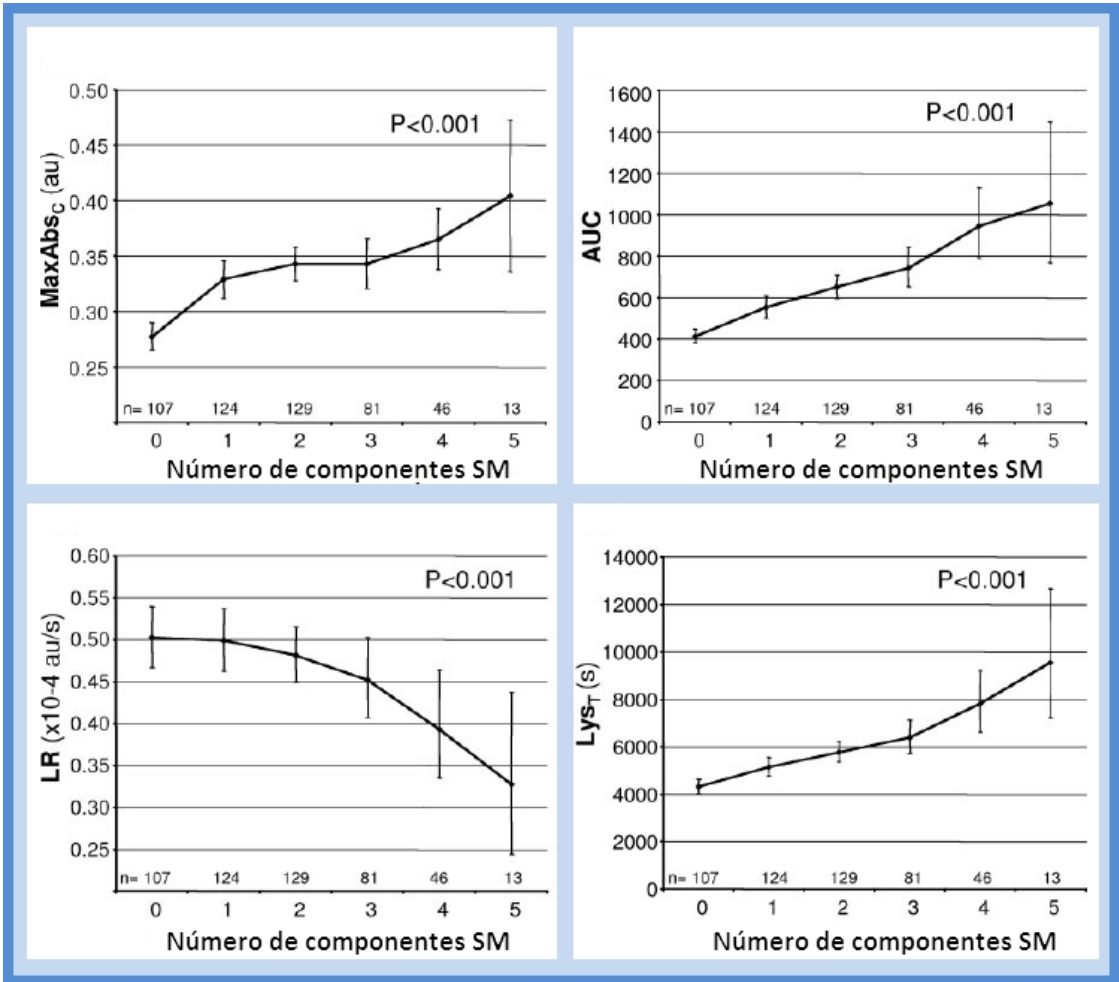


Figura 7: Relación entre variables turbidimétricas y el número de componentes del SM. MaxAbs: máxima absorbencia. AUC: área bajo la curva, que refleja el balance entre la formación del trombo y la lisis.

LR: tasa de lisis (del inglés lysis rate). LysT: tiempo para la lisis completa (del inglés time to complet lysis). Modificada de Carter AM et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007²¹⁸.

Los trombos obtenidos de pacientes con SM están compuestas de fibras más gruesas y tienen tiempos de lisis más prolongados en comparación con aquellos que no tienen resistencia a la insulina²¹⁹.

Otras investigaciones llevadas a cabo en sujetos sanos, en los que provocan distintas situaciones de hipo-hiperinsulinemia y de eu-hiperglucemia, mediante diferentes clamps, objetivan que la hiperinsulinemia puede provocar una alteración selectiva en la fibrinólisis independientemente de los niveles de glucemia, mientras que la hiperglucemia puede tener un efecto procoagulante. Demuestran que en casos de hiperinsulinemia existe menor actividad del PA, debido a un incremento en la concentración y actividad de PAI-1; y en casos de hiperglucemia existe un aumento del complejo trombina-antitrombina y del factor tisular²²⁰ (figura 8).

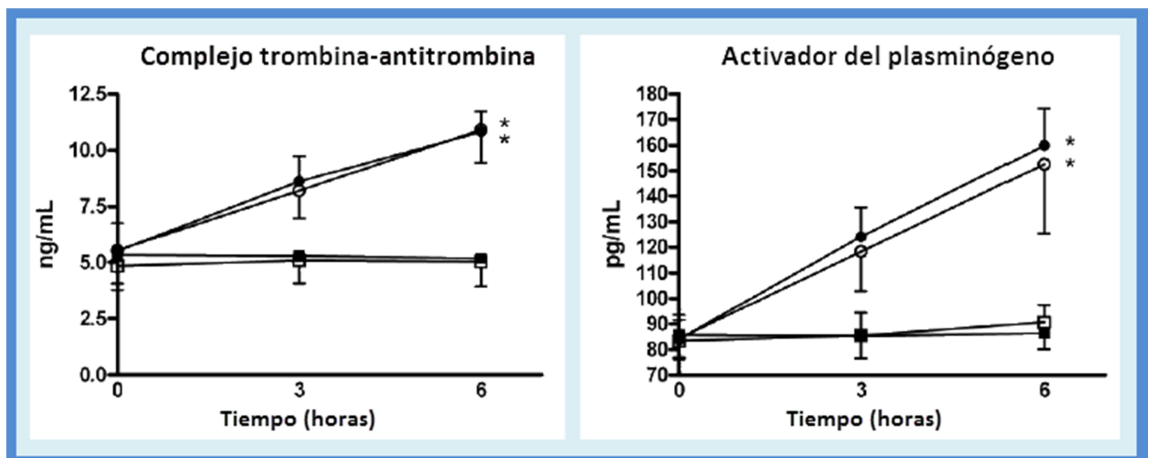


Figura 8: Alteración de la fibrinólisis en función de los niveles de glucosa e insulina. Los pacientes con hiperglucemia (dibujados con un círculo) tienen un aumento en complejo trombina-antitrombina frente a los paciente con hiperinsulinemia (dibujados en negro) tienen menor actividad del PA, debido a un incremento en la concentración y actividad de PAI-1. Modificada de Stegenga ME et al, Diabetes. 2006²²⁰.

Este estado protrombótico propio de la resistencia a la insulina, estaría también facilitado por un aumento de la viscosidad sanguínea, un incremento de la actividad plaquetaria y por un estado de hipercoagulabilidad provocado por una activación de la cascada de la coagulación como consecuencia de una elevación del fibrinógeno y los factores VII y VIII de la coagulación.

En resumen, todas estas alteraciones descritas en el SM y en la resistencia a la insulina pueden contribuir a empeorar la respuesta a las terapias de reperfusión iv en el ictus y al pronóstico funcional en general. Esta observación podría tener implicaciones prácticas a la hora de seleccionar pacientes con ictus isquémico candidatos a terapias de reperfusión más agresivas (terapias intraarteriales).

1.3.3.2 INVESTIGACIONES PREVIAS

Como ya hemos comentado, la mayoría de los estudios se han centrado en la relación entre SM y enfermedad cerebrovascular en el campo de la prevención primaria y secundaria de ictus. Sin embargo el director de esta tesis, ha publicado algunos trabajos previos en los que se observó que el SM se asocia con una mayor resistencia a la recanalización arterial y un peor pronóstico en pacientes con ictus isquémicos tratados con trombolisis iv²²¹.
[222](#).

El primero de los trabajos²²¹ incluyó un total de 100 pacientes con ictus isquémico y oclusión de ACM tratados con tPA iv. Un 58% de los pacientes incluidos, tenían SM de acuerdo a la definición de AHA/NHLBI-

2005⁷¹. La tabla 6 muestra el análisis multivariado realizado, incluyendo SM y cada uno de sus componentes como variables independientes. Se encontró que la relación con la resistencia a la recanalización arterial a las 24 horas era más estrecha para el SM (OR 4.7, 95% CI [1.7–13.6], $p=0.004$) que para cada uno de sus componentes de forma asilada; lo cual apoya la importancia de este concepto clínico.

	Regresión logística no ajustada	Regresión logística ajustada
SM	5.7 (2.1–14.9), 0.0004	4.7 (1.7–13.6), 0.004
Obesidad	2.5 (0.9–6.7), 0.07	2.5 (0.8–7.4), 0.11
HTA	1.3 (0.5–2.9), 0.55	1.3 (0.5–3.4), 0.57
Hiperglucemia	4.2 (1.6–11.2), 0.004	2.8 (1.1–7.9), 0.04
Aumento de TG	3.6 (1.2–11.5), 0.03	3.0 (0.8–10.9), 0.08
Disminución de colesterol-HDL	0.5 (0.2–1.3), 0.19	0.5 (0.2–1.4), 0.21

Tabla 6: Análisis multivariado que muestra la relación entre el SM y cada uno de sus componentes con la resistencia a la recanalización arterial. Modificada de Arenillas JF et al, Neurology 2008²²¹.

En el total de la serie, el SM se asoció con mal pronóstico funcional a largo plazo (OR 2.4 [1.1–5.4], $p=0.03$), aunque dicha asociación sólo se mantuvo significativa tras el ajuste de variables en el subgrupo de pacientes con ictus isquémico de origen ATH (OR 13.9 [1.3–148.7], $p=0.02$). En resumen en este primer trabajo se demostró que los pacientes con SM tienen peor

respuesta a la trombolisis iv, reflejado por una mayor resistencia a la recanalización arterial.

En el segundo trabajo publicado²²², en la misma línea que el anterior, Arenillas et al observaron que, al igual que estudios previos habían demostrado que el riesgo de tener un ictus entre la población con SM era mayor en mujeres que en varones²²³, el efecto de la resistencia a la recanalización arterial en ictus isquémicos agudos, también era superior en el subgrupo de las mujeres. Incluyeron un total de 125 pacientes (61% con SM de acuerdo a la definición de AHA/NHLBI-2005⁷¹), con oclusión de ACM, tratados con trombolisis iv. Como se muestra en la figura 9, el SM se asoció con la resistencia a la recanalización arterial a las 24 horas de una forma más pronunciada en las mujeres (OR 17.5 [1.9–163.1]) que en los varones (OR 5.1 [1.6–15.6]) ($p < 0.001$).



Figura 9: Relación entre SM y resistencia a la recanalización arterial en función del sexo. Modificada de Arenillas JF et al, Stroke 2009²²².

Estos dos estudios estaban basados en una definición clínica del SM, y por tanto sujeta a diversas críticas, y no en una medida directa de la resistencia a la insulina, que como hemos estado viendo se puede considerar el mecanismo fisiopatológico subyacente, ni en una determinación de biomarcadores presentes en este tipo de pacientes.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra **hipótesis** es que la resistencia a la insulina, a través de todas las alteraciones que la acompañan, y que hemos descrito (hiperglucemia, disfunción endotelial, estado pro-inflamatorio, alteración del sistema fibrinolítico endógeno), puede contribuir a empeorar el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico tratados con terapias de reperfusión endovenosas, por un lado amplificando el daño isquémico cerebral y por otro confiriendo una mayor resistencia a la recanalización arterial.

Por tanto los **objetivos principales** de esta tesis son:

1. Estudiar la relación entre la resistencia a la insulina y la respuesta al tratamiento trombolítico endovenoso del infarto cerebral agudo.
2. Describir el perfil temporal de varias citoquinas relacionadas con la resistencia a la insulina, durante la fase aguda del infarto cerebral.
3. Investigar la relación de la concentración sanguínea de varios biomarcadores relacionados con la resistencia a la insulina, con el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico tratados con tPA endovenoso.



METODOLOGÍA

3 METODOLOGÍA

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Los dos trabajos que conforman esta tesis, son estudios prospectivos y longitudinales de cohortes hospitalarias de pacientes con ictus isquémico agudo en el territorio de ACM de evolución que recibieron tratamiento con tPA iv en un hospital universitario (Hospital Clínico Universitario de Valladolid) entre junio del 2008 y julio del 2011, siguiendo los protocolos de la Unidad de Ictus. El periodo de seguimiento fue de 90 días, e incluyó evaluaciones neurológicas, de neuroimagen, ultrasonográficas, moleculares y funcionales, mediante la utilización de un protocolo preestablecido. Los datos se registraron en una base de datos de forma prospectiva para su posterior análisis. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del centro donde se realizaron los estudios.

3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES

A continuación se enumeran los criterios de inclusión y exclusión, compartidos por ambas investigaciones.

Criterios de inclusión

- Síntomas atribuibles a un ictus isquémico con afectación del territorio de la ACM

- Detección de una oclusión de la ACM mediante TCCD/TCD, demostrada previamente al inicio del tratamiento trombolítico.
- Realización de tratamiento trombolítico con tPA iv en una dosis estándar de 0.9 mg/kg.
- Posibilidad de extracción de muestras sanguíneas durante las primeras 24 horas (en los tiempos requeridos en cada estudio: a las 24-48 horas para el primer estudio; en los tiempos pre-trombolisis iv, inmediatamente después de la infusión de tPA y a las 24 horas para el segundo estudio)
- Obtención de consentimiento informado
- Ausencia de todos los criterios de exclusión

Los siguientes criterios son específicos del primer estudio y pretenden eliminar el potencial efecto confusor de la hiperglucemia sobre el pronóstico de los ictus, así como la posibilidad de determinación errónea del índice de HOMA por la presencia de insulina exógena:

- Ausencia de tratamiento previo con insulino terapia
- Glucemia al ingreso < 155 mg/dl. Se seleccionó este punto de corte, de acuerdo con nuestro protocolo local de tratamiento de la hiperglucemia en la fase aguda del ictus, que está fundamentado en los resultados del estudio GLIAS²²⁴, en concordancia con el consenso de la American Diabetes Association²²⁵. El estudio GLIAS identifica un valor de glucemia \geq 155 mg/dl como un predictor independiente de mal pronóstico en los pacientes con ictus isquémico agudo.

Criterios de exclusión

- Ventana temporal acústica insuficiente que impida la monitorización por TCCD/TCD.
- Ausencia de oclusión de la ACM por TCCD/TCD
- Denegación del consentimiento informado
- Presencia de algún criterio de exclusión para el tratamiento con tPA iv:
 - Hemorragia intracerebral en la neuroimagen.
 - Crisis comiciales al inicio del ictus, excepto que se demuestre la presencia de isquemia cerebral u oclusión arterial en la neuroimagen/neurosonología.
 - TTPA alargado si el paciente ha recibido heparina sódica en las 48 horas anteriores.
 - Tratamiento con heparinas de bajo peso molecular a dosis anticoagulantes en las últimas 24 horas.
 - Tratamiento con anticoagulantes orales y INR ≥ 1.7 .
 - Ictus o trauma craneal en los 3 meses anteriores.
 - Historia previa de hemorragia cerebral, subaracnoidea o intracraneal.
 - Lesión previa conocida en el SNC (neoplasia con riesgo aumentado de sangrado, aneurisma, MAV, cirugía espinal).

- Plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$
- Presión arterial sistólica ≥ 185 mmHg y presión arterial diastólica ≥ 105 mmHg antes de la infusión, o cuando se precisen medidas hipotensoras agresivas (más de dos dosis iv de hipotensores tras el ingreso en la Unidad de Ictus).
- Glucemia >400 ó < 50 mg/dl.
- Diátesis hemorrágica conocida.
- Hemorragia sistémica importante reciente ó manifestada en el último mes.
- Retinopatía diabética hemorrágica (relativa en función de la situación neurológica del paciente)
- Punción lumbar ó arterial no susceptible de compresión en los 7 días anteriores.
- Cirugía mayor en los 14 días anteriores.
- Aneurisma arterial ó malformación arteriovenosa cerebral.

El siguiente criterio de exclusión es específico del segundo trabajo y pretende eliminar la posibilidad de una alteración en los niveles de citoquinas:

- Presencia de comorbilidad que pudiera afectar los niveles de citoquinas (enfermedad inflamatoria, tumores...).

Proceso diagnóstico

Para asegurar la correcta selección de los pacientes, se realizaron de forma sistemática las siguientes exploraciones:

1. Historia clínica y exploración física.
2. Analítica general en urgencias, incluyendo hemograma, pruebas básicas de coagulación y bioquímica, previa al tratamiento trombolítico.
3. Electrocardiograma.
4. Radiografía de tórax.
5. Estudio de neuroimagen con TC previo al tratamiento trombolítico y a las 24 horas después del mismo.
6. TCCD o TCD para la detección y monitorización de la oclusión de ACM al ingreso en la unidad de ictus.
7. Eco-doppler de los TSA.
8. Durante el ingreso se completó el estudio etiológico del ictus mediante la realización de ecocardiografía transtorácica y/o transesofágica, ECG-Holter, detección de shunt derecha-izquierda por DTC. El estudio inmunológico, serológico y de trombofilias se reservó para los pacientes sin factores de riesgo vascular conocidos.

3.3 MUESTRA ESTUDIADA

En el primer trabajo, se estudiaron 193 pacientes consecutivos con ictus isquémico agudo, que cumplían criterios para recibir tratamiento trombolítico con tPA iv. De ellos, 109 cumplieron todos los criterios de inclusión y exclusión antes mencionados. Las razones para excluir al resto de los candidatos están esquematizadas en la figura 10.

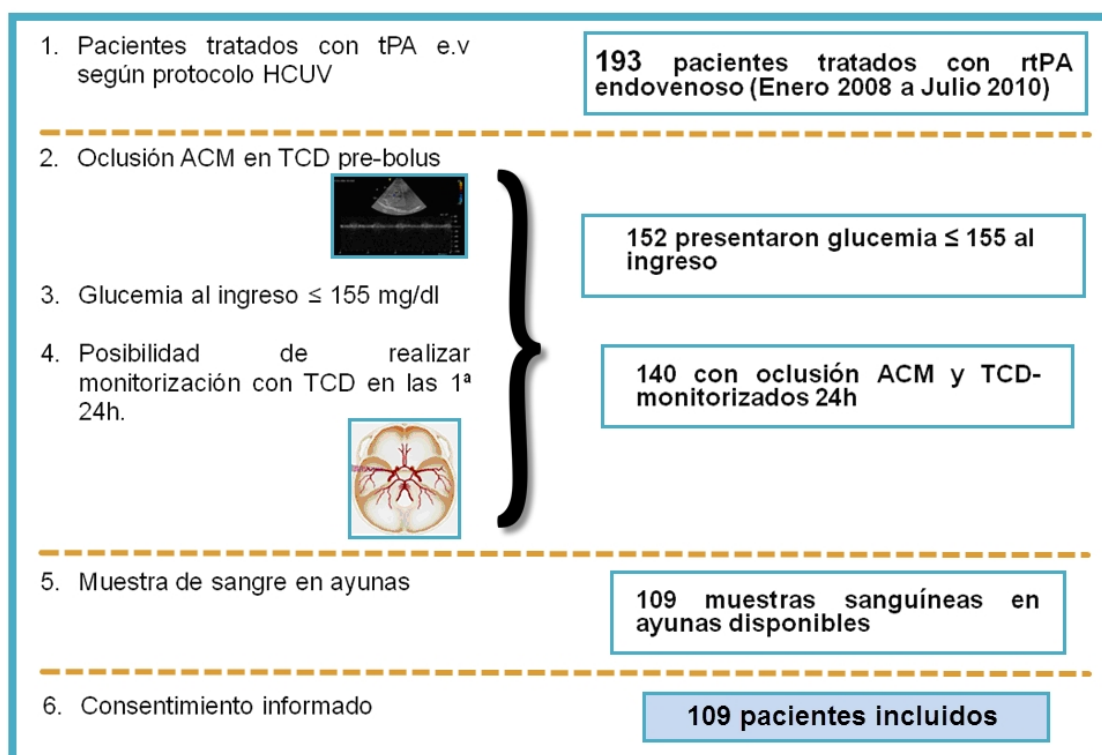


Figura 10: Diagrama explicativo del proceso de selección de los pacientes incluidos en el primer trabajo

En el segundo trabajo, se estudiaron pacientes con ictus isquémicos ingresados en nuestra Unidad de Ictus de Septiembre de 2009 a Julio de

2011, que habían recibido tratamiento trombolítico con tPA iv y en los cuales se documentó oclusión de ACM mediante estudio neurosonológico.

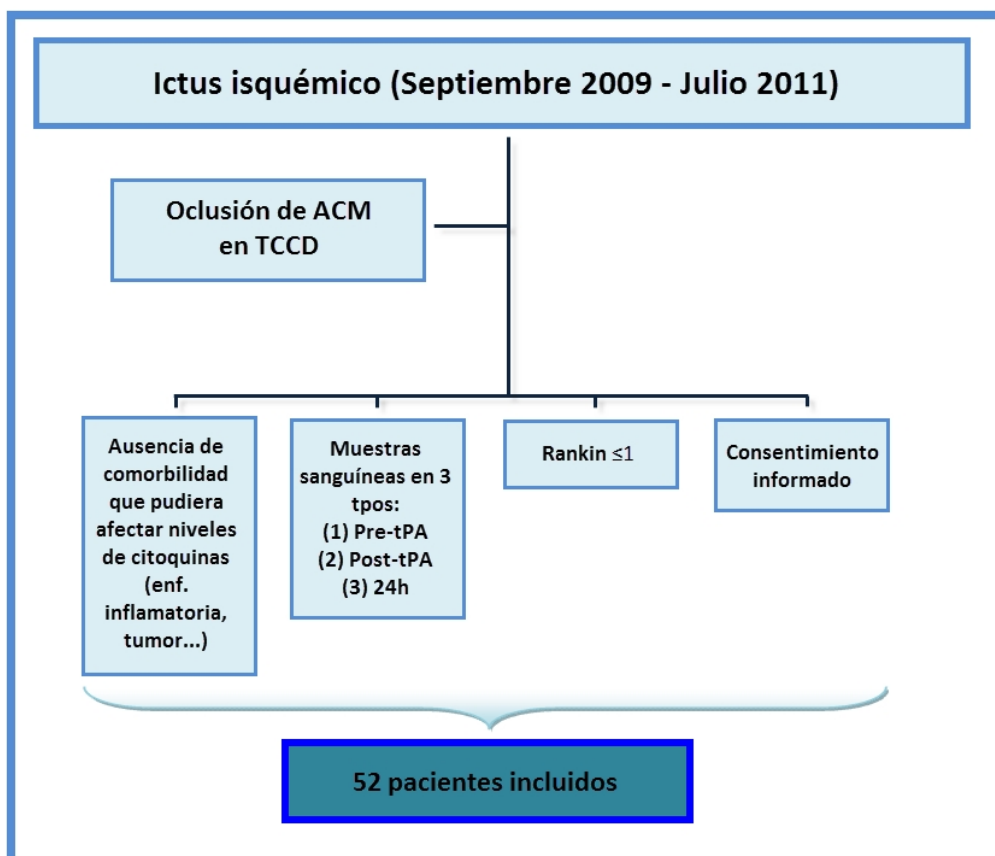


Figura 11: Diagrama explicativo del proceso de selección de los pacientes incluidos en el segundo trabajo.

3.4 VARIABLES CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS BASALES

Se realizó una historia clínica detallada de todos los pacientes, recogiendo las siguientes variables clínicas basales (ver cuaderno de recogida de datos en Anexo I): edad, sexo, factores de riesgo vascular (tabaquismo, HTA, DM, hipercolesterolemia) y medicación concomitante. A su llegada a

urgencias, se determinó la temperatura corporal, la TAS y TAD, y la glucemia capilar. Con la información de las pruebas complementarias y los datos de neuroimagen, se clasificó el ictus según la clasificación TOAST (Anexo II)²²⁶ en las siguientes categorías etiológicas: CE, ATH, otras causas e indeterminado.

El grado de afectación neurológica se determinó mediante la escala National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)²²⁷ (Anexo III) en el momento basal (antes de la administración de tPA) y a las 24 horas del inicio de los síntomas. Se definió como mejoría o empeoramiento clínico precoz a la disminución o aumento en 4 o más puntos respectivamente en la puntuación en la escala NIHSS³.

El grado de discapacidad funcional se evaluó al tercer mes mediante la escala de Rankin modificada (mRS)²²⁸ (Anexo IV). Se consideró buen pronóstico al tercer mes si su puntuación era inferior o igual a 2.

En todos los pacientes se realizó una TC basal, para descartar la presencia de hemorragia y evaluar la presencia de signos precoces de isquemia, de acuerdo con la escala Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECST)⁶¹. Tras 24 horas, o antes en caso de empeoramiento clínico, se practicó una nueva TC craneal. La presencia de edema o transformación hemorrágica intracraneal se definió según los criterios de los estudios ECASS²²⁹. Si la transformación hemorrágica se acompañaba de un incremento en ≥ 4 puntos de la escala NIHSS, se clasificó la hemorragia como SICH.

3.5 ESTUDIO ULTRASONOGRÁFICO

El protocolo neurosonológico incluyó un Eco-doppler o Dúplex TSA y un TCD o TCCD previo al inicio del tratamiento trombolítico, además de un TCD o TCCD de control a la hora, dos horas y 24 horas desde el final de la infusión de tPA, para monitorizar el estado de la arteria.

3.5.1 ECO-DOPPLER DE TSA

Al inicio del tratamiento trombolítico, se realizó en todos los pacientes, un estudio de Eco-doppler o Dúplex TSA (sonda lineal de 5 a 10 MHz; ecógrafo Toshiba Aplio XG: Toshiba Medical System Europe, Zoetermeer, Nehterlands) para valorar la presencia de patología carotídea extracraneal. El diagnóstico de estenosis carotídea y la valoración de su gravedad se basó en los parámetros de velocidad pico sistólica (VPS) y velocidad final diastólica (VFD).

3.5.2 ECO-DOPPLER/DOPPLER TC

Se realizó un estudio basal completo de TCD y/o TCCD a todos los pacientes a su llegada a urgencias, previo a la administración de tPA. En caso de TCD se realizó mediante un equipo power-M-mode-equipped Sonara (Viasys Healthcare).

En la exploración basal, se determinó la presencia y localización de la oclusión arterial mediante la escala TIBI²³⁰. Una oclusión proximal se definió por la ausencia de flujo o la presencia de una señal de flujo mínimo (TIBI 0 ó 1) en la ACM a una profundidad entre 45 y 65 mm, acompañada de la presencia de diversión de flujo en la ACA y/o ACP ipsilateral. El diagnóstico de oclusión distal se realizó ante la presencia de un flujo amortiguado o disminuido (TIBI 2 ó 3) en la ACM a la misma profundidad, con una velocidad menor del 30% con respecto a la misma arteria contralateral, y signos de diversión de flujo en las arterias vecinas²³⁰.

Para identificar la recanalización, el mismo explorador realizó la exploración al final del tratamiento, a las dos horas del inicio del mismo y a las 24 horas. Se definió recanalización parcial la aparición de un flujo amortiguado o disminuido (TIBI 2 ó 3) en una arteria que presentaba inicialmente flujo ausente o mínimo (TIBI 0 ó 1). La mejoría del flujo hasta alcanzar un patrón estenótico (TIBI 4) o normal (TIBI 5) se consideró recanalización completa²³¹. La ausencia de cambios de flujo arterial se consideró falta de recanalización arterial.

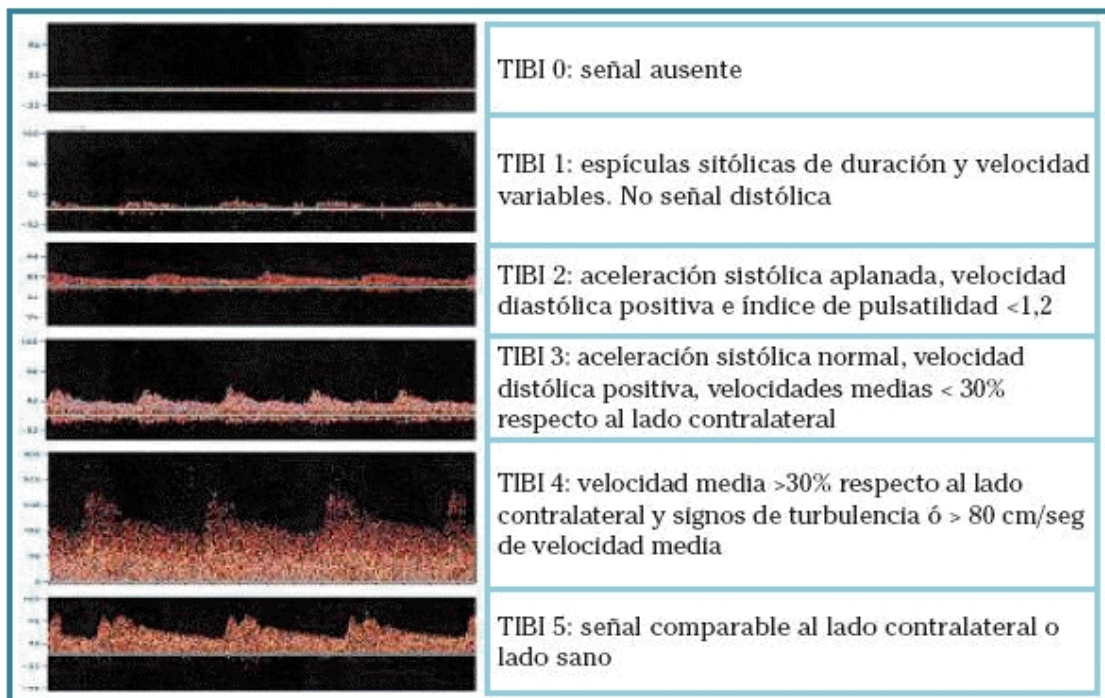


Figura 12: Patrones de flujo de TIBI. Modificado de Demchuk et al, Stroke 2001²³⁰.

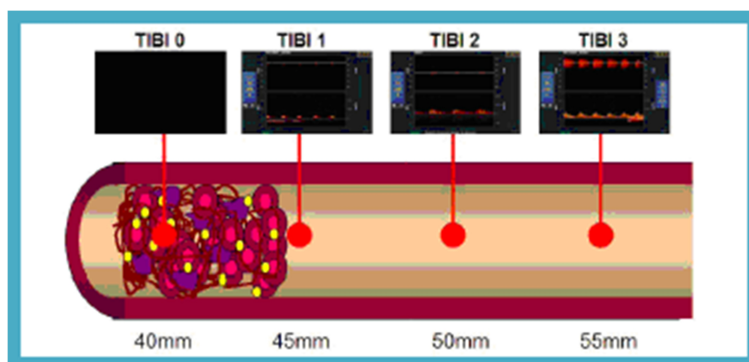


Figura 13: Escala TIBI. Patrones de oclusión (TIBI 0-3) en función de la distancia relativa del trombo al segmento arterial insonado. Cortesía del Dr. Carlos Molina, Hospital Vall d'Hebron.

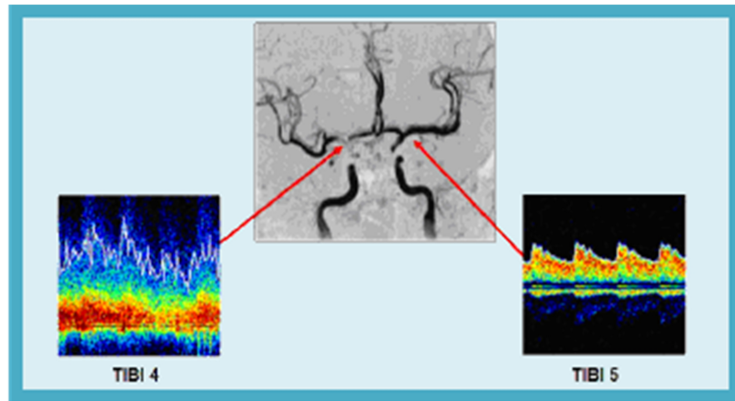


Figura 14: Escala TIBI. Patrón estenótico (TIBI 4) y patrón normal (TIBI 5).

3.6 VARIABLES PRONÓSTICAS

Los parámetros clínico-radiológicos analizados como variables pronósticas fueron:

- a) En el primer estudio:
 - Buen pronóstico al tercer mes.
 - Volumen del infarto en TC 24 horas.
 - Transformación hemorrágica sintomática.

- b) En el segundo estudio:
 - Buen pronóstico al tercer mes.
 - Presencia de mejoría clínica precoz.
 - Volumen del infarto en TC 24 horas.

- Transformación hemorrágica sintomática.

Respecto a las variables pronósticas del estudio neurosonológico:

a) En el primer trabajo:

- Resistencia a la recanalización completa arterial en las primeras 24 horas.

b) En el segundo trabajo:

- Recanalización arterial completa/parcial en las primeras 2 horas.

3.7 PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA MEDIANTE EL ÍNDICE DE HOMA

En el primer trabajo, se determinó la resistencia a la insulina mediante el índice de HOMA siguiendo la fórmula descrita por Matthews et al²³²: Índice de HOMA = glucosa mg/dL x insulina mU/L/ 405. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas 24-48 horas después de la admisión del paciente en la Unidad de Ictus. La determinación de la insulina y la glucemia basal, para el cálculo de la resistencia a la insulina siguió el siguiente procedimiento:

- Examen cuidadoso para descartar cualquier circunstancia considerada criterio de exclusión (véase apartado 3.1).
- Extracción de sangre de una vena antecubital en ayunas, que se dejó reposar a la temperatura de la habitación durante 15 minutos.
- Centrifugación 3500 rpm a 4°C durante 15 minutos.

- Pipeteado del suero en alícuotas. Etiquetado mediante códigos que aseguraran un posterior análisis ciego de las muestras.
- Inmediata determinación de la concentración de insulina mediante un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ARCHITECT insulin assay; ABBOTT, Wiesbaden, Alemania). Esta concentración está expresada en miliunidades por litro.
- Inmediata determinación de la concentración de glucosa empleando métodos estandarizados, y expresado en miligramos por decilitro.
- Ambas determinaciones fueron realizadas por duplicado, empleando para el análisis el valor medio de ambas determinaciones.

3.8 PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

En el segundo trabajo, se determinó la concentración de los distintos biomarcadores relacionados con la resistencia a la insulina. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas antes del inicio de la infusión de tPA iv, inmediatamente después de finalizar la perfusión de tPA iv y a las 24 horas de la admisión en la Unidad de Ictus. Además se extrajeron muestras a 10 controles voluntarios sanos de edades similares al grupo de pacientes, que fueron reclutados de entre los trabajadores del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. La determinación de las moléculas siguió el siguiente procedimiento:

1. Examen cuidadoso para descartar cualquier circunstancia considerada criterio de exclusión (véase apartado 3.1).

2. Extracción de sangre de una vena antecubital en ayunas, que se dejó reposar a la temperatura de la habitación durante 15 minutos.
3. Centrifugación 3500rpm a 4°C durante 15 minutos.
4. Pipeteado del plasma en alícuotas. Etiquetado mediante códigos que aseguraran un posterior análisis ciego de las muestras.
5. Almacenamiento en un congelador a -80°C hasta su análisis.
6. Determinación de la concentración de las distintas moléculas (Péptido-C, Grelina, GIP, GLP1, Glucagón, Insulina, Leptina, Resistina, Visfatina, IL6 y TNF α) empleando un multiplex Bio-Rad assay (Hercules, CA, USA) en la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (IBC). Estas concentraciones están expresadas en nanogramos por mililitro.

3.9 ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE AMBOS ESTUDIOS

Las figuras 15 y 16 muestran los esquemas de protocolos de ambos trabajos.

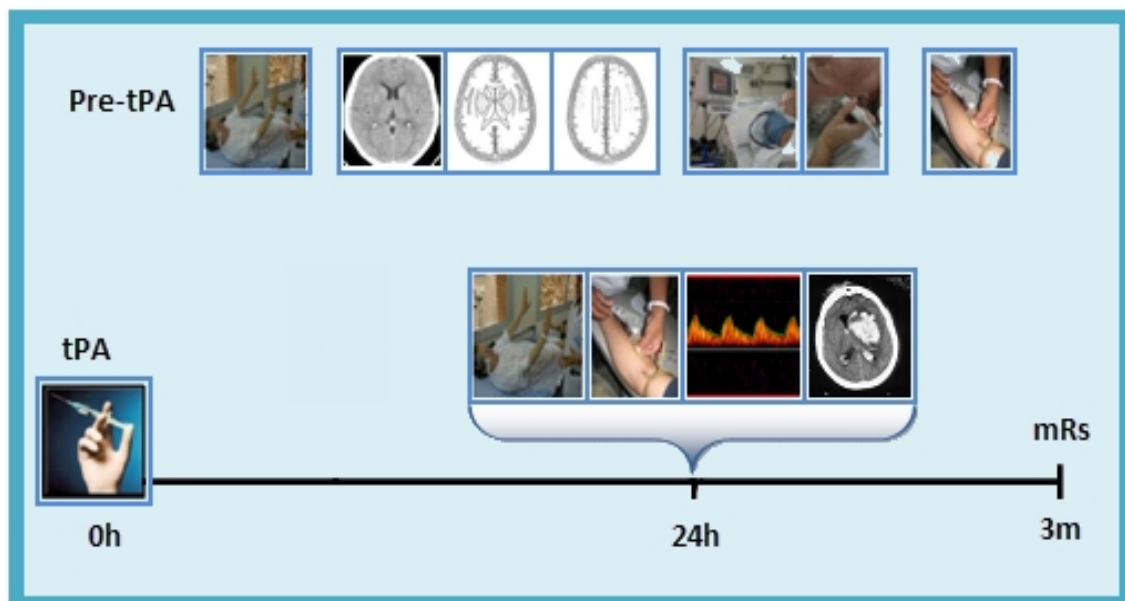


Figura 15: esquema del protocolo del primer trabajo

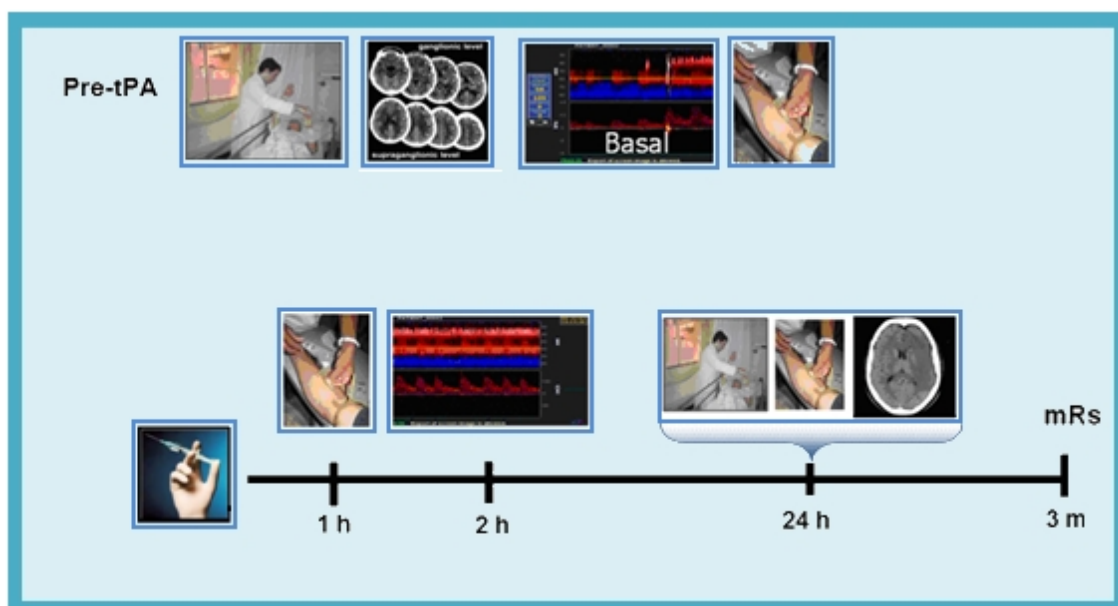


Figura 16: esquema del protocolo del segundo trabajo

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 17.0; SPSS, Chicago, IL). Inicialmente se realizó la estadística descriptiva (media, desviación estándar, mediana, intervalo, tablas de frecuencia) de las principales variables.

Posteriormente se ha realizado el análisis bivariado. Se ha empleado el test χ^2 para comparar dos variables categóricas, y la T student o U de Mann Whitney, según lo apropiado, para comparar una variable categórica y una variable continua. Todas las variables continuas excepto NIHSS, ASPECTS, leucocitos y plaquetas, siguieron una distribución normal.

En el primero de los trabajos, la variable pronóstica primaria fue pronóstico funcional al tercer mes, y los endpoints secundarios fueron resistencia a la recanalización arterial, SICH y volumen de la hipodensidad a las 24 horas. Se aplicaron modelos de regresión logística, cuando se observaban diferencias estadísticamente significativas en los correspondientes análisis bivariados, para evaluar la relación entre la resistencia a la insulina (índice de HOMA), mal pronóstico funcional al tercer mes, SICH, volumen del infarto y resistencia a la recanalización arterial. Incluimos en estos modelos aquellas variables con $p < 0.1$ en el correspondiente análisis bivariado. Además, computamos la edad, sexo, y otras variables con ORs significativas para un mal pronóstico funcional al tercer mes y resistencia a la recanalización arterial asociados con un aumento en los terciles de HOMA, tomando el tercil inferior como referencia. Los resultados de los modelos de regresión logística se expresaron en forma de

cociente de probabilidades (OR) y su correspondiente intervalo de confianza al 95% (CI). Un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

En el segundo trabajo, el análisis de los biomarcadores relacionados con la resistencia a la inulina, se realizó mediante test no paramétricos. Las concentraciones de las proteínas requirieron una transformación logarítmica, para satisfacer una hipótesis lineal. Los niveles de los biomarcadores fueron en primer lugar comparados entre el grupo de pacientes y los controles sanos empleando el test de U de Mann-Whitney. La variación de los niveles de proteínas durante las primeras 24 horas, fue evaluada con el test de Friedman y Wilcoxon. La corrección de Bonferroni fue empleada para comparaciones múltiples considerando $p < 0.016$ como estadísticamente significativa. En este segundo trabajo, las variables pronósticas fueron pronóstico funcional al tercer mes, mejoría neurológica precoz, recanalización arterial a las 2 horas, volumen del infarto y SICH. La relación entre estas variables pronósticas y los niveles de los biomarcadores se analizó en distintos pasos. Primero, para evaluar la relación entre los biomarcadores (incluidos la variación de sus niveles en las primeras 24 horas) y las variables pronósticas, se aplicaron modelos de regresión logística crudos. Aquellas moléculas que mostraron una $p \leq 0.2$ en los respectivos análisis de regresión crudos, fueron incluidas en un modelo de regresión múltiple ajustado por las variables basales que habían mostrado una $p \leq 0.1$ en análisis bivariado correspondiente. Los resultados de los modelos de regresión logística se expresaron en forma de cociente de probabilidades (OR) y su correspondiente intervalo de confianza al 95% (CI). En un segundo paso, se calcularon curvas COR, en aquellas moléculas que habían mostrado una $p \leq 0.1$ en los modelos de regresión logística ajustados, con el objetivo de determinar su valor predictivo debajo de la curva así como el mejor valor de

corte para discriminar entre un pronóstico favorable y desfavorable. Se escogieron puntos con AUROC por encima de 0.6 para dicotomizar las variables.



RESULTADOS

4 RESULTADOS

Los resultados de los dos trabajos de investigación presentados en esta tesis, han sido publicados en Diabetes Care el primero de ellos y en Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism el segundo (Anexo V).

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

En el primer trabajo, se estudiaron 109 pacientes consecutivos, con oclusión de ACM documentada y que no presentaban hiperglucemia al ingreso $>155\text{mg/dl}$, que fueron tratados con tPA iv. Cuarenta y siete (43.1%) de ellos eran mujeres con una edad media de 71.0 ± 11.3 años.

En la tabla 7 se presenta un resumen de las principales características demográficas y variables basales de la población perteneciente al tercil superior de HOMA frente a la población perteneciente al resto de los terciles de HOMA.

VARIABLE	Grupo total n = 109	Tercil superior n = 38	Resto de terciles n = 71	p
Sexo, femenino	47 (43.1%)	18 (47.4%)	29 (40.8%)	0.512
Edad	71.0 \pm 11.3	70.57 \pm 12.49	71.23 \pm 10.76	0.774
Fumador activo últimos 5 años	28 (25.7%)	9 (23.7%)	19 (26.8%)	0.726
Hábito enólico $> 40\text{ g/d}$	9 (8.3%)	1 (2.6%)	8 (11.3%)	0.119

Historia de HTA o diagnóstico en el ingreso	68 (62.4%)	25 (65.8%)	43 (60.6%)	0.591
DM	12 (11%)	8 (21.1%)	4 (5.6%)	0.014
Hipercolesterolemia	45 (41.3%)	17 (44.7%)	28 (39.4%)	0.592
Tratamiento previo con aspirina	29 (26,6%)	10 (26.3%)	19 (26.8%)	0.960
Tratamiento previo con clopidogrel	5 (4.6%)	0 (0%)	5 (7%)	0.094
Tratamiento previo con estatina	30 (27.5%)	12 (31.6%)	18 (25.4%)	0.488
Clasificación etiológica				0.292
CE	51 (46.8%)	15 (39.5%)	36 (50.7%)	
ATH	25 (22.9%)	13 (34.2%)	12 (16.9%)	
IND	27 (24.8%)	9 (23.7%)	18 (25.4%)	
Lacunar	5 (4.6%)	1 (2.6%)	4 (5.6%)	
Otros	1 (9%)	0 (0%)	1 (1.4%)	
NIHSS basal	10 (6-18.5)	10.5 (7.0-19.25)	10 (6-18)	0.610
Glucemia pre-tPA, mg/dL	107.57±21.76	114.81±20.96	103.70±21	0.010
Leucocitos, x10 ³ /μl	7960 (6230-9090)	8695.00 (7047.5-9565.0)	7100 (5760-8730)	0.007
Plaquetas, x10 ³ /μl	202000 (164500 - 234500)	206500 (175000-236000)	195000 (162250-230000)	0.298
TAS basal, mm Hg	147.81±23.84	151.42±20.26	145.88±25.49	0.250
TAD basal, mm Hg	78.44±14.03	80.60±13.57	77.28±14.22	0.240
ASPECTS	10 (9.25-10)	10 (9-10)	10 (9.75-10)	0.970

Tabla 7: Distribución de variables demográficas y basales del total de pacientes, y de la población perteneciente al tercil superior de HOMA frente a la población perteneciente al resto de los terciles de HOMA.

Un análisis univariado mostró que los pacientes pertenecientes al tercil superior de HOMA tenían una historia de DM más frecuente ($p=0.014$), glucemias pre-tPA más elevadas ($p=0.01$), y mayor concentración de leucocitos en sangre ($p=0.007$). Sin embargo no existían diferencias estadísticamente significativas en las principales variables basales pronósticas en los diferentes grupos, incluyendo edad y NIHSS.

En el segundo trabajo se incluyeron un total de 52 pacientes consecutivos con ictus isquémico y oclusión documentada de ACM, tratados con tPA iv. De ellos, 32 (61.53%) eran mujeres, edad media de 75.38 ± 8.89 años y con una mediana de NIHSS de 15 (9-21). La tabla 8 muestra la distribución de las principales variables demográficas y clínicas, así como los niveles basales de los biomarcadores.

VARIABLE	
Sexo, femenino	32 (61.5%)
Edad	75.38 ± 8.89
Fumador activo últimos 5 años	11 (21.2%)
Historia de HTA o diagnóstico en el ingreso	32 (61.5%)
DM	6 (11.5%)
Hipercolesterolemia	15 (28.8%)
Etiología CE	24 (46.2%)
NIHSS basal	15 (9-21)
Glucemia pre-tPA, mg/dL	119.07 ± 27.86

Glucemia ayunas 24h,mg/dL	107.25 ± 33.61
Leucocitos, x10 ³ /μl	8.15 (6.43-9.28)
Plaquetas, x10 ³ /μl	193 (165-229)
TAS, mm Hg	153.42 ± 17.16
TAD, mm Hg	79.98 ± 10.67
ASPECTS	9 (8-10)
Péptido C_0h, pg/ml	1427.10 (1161.46 - 2032.30)
Péptido C_1h, pg/ml	1925.43 (1471.33 - 2818.98)
Péptido C_24h, pg/ml	1649.31 (1209.86 - 2173.72)
Grelina_0h, pg/ml	62.50 (38.77 - 135.74)
Grelina_1h, pg/ml	93.99 (51.40 - 156.83)
Grelina_24h, pg/ml	116.66 (84.62 - 150.83)
GIP_0h, pg/ml	46.54 (25.44 - 118.08)
GIP_1h, pg/ml	109.51 (63.51 - 194.32)
GIP_24h, pg/ml	78.10 (58.67 - 133.88)
GLP1_0h, pg/ml	725.04 (545.93 - 1002.32)
GLP1_1h, pg/ml	920.71 (459.09 - 1550.04)
GLP1_24h, pg/ml	1279.23 (1007.16 - 1892.57)
Glucagón_0h, pg/ml	757.57 (624.91 - 855.62)
Glucagón_1h, pg/ml	919.35 (805.26 - 1105.59)
Glucagón_24h, pg/ml	891.56 (805.57 - 990.46)
Insulina_0h, pg/ml	1791.20 (1252.83 - 2731.15)
Insulina_1h, pg/ml	3154.96 (1559.37 - 5279.02)

Insulina_24h, pg/ml	2945.71 (2303.15 - 4827.09)
Leptina_0h, pg/ml	2317.50 (1463.35 - 4120.33)
Leptina_1h, pg/ml	2560.31 (1370.97 - 3990.47)
Leptina_24h, pg/ml	1933.93 (1307.49 - 5403.32)
Resistina_0h, pg/ml	2766.56 (1929.42 - 5640.59)
Resistina_1h, pg/ml	3619.16 (2090.16 - 12247.91)
Resistina_24h, pg/ml	1816.83 (1411.92 - 3251.75)
Visfatina_0h, pg/ml	35.68 (35.68 - 1918.54)
Visfatina_1h, pg/ml	1886.38 (35.68 - 7853.48)
Visfatina_24h, pg/ml	943.55 (12.40 - 1727.51)
IL6_0h, pg/ml	20.17 (14.86 - 31.44)
IL6_1h, pg/ml	28.46 (19.71 - 39.57)
IL6_24h, pg/ml	32.31 (22.63 - 48.08)
TNF α _0h, pg/ml	36.13 (26.27 - 54.19)
TNF α _1h, pg/ml	37.20 (22.83 - 66.67)
TNF α _24h, pg/ml	46.43 (33.71 - 59.33)

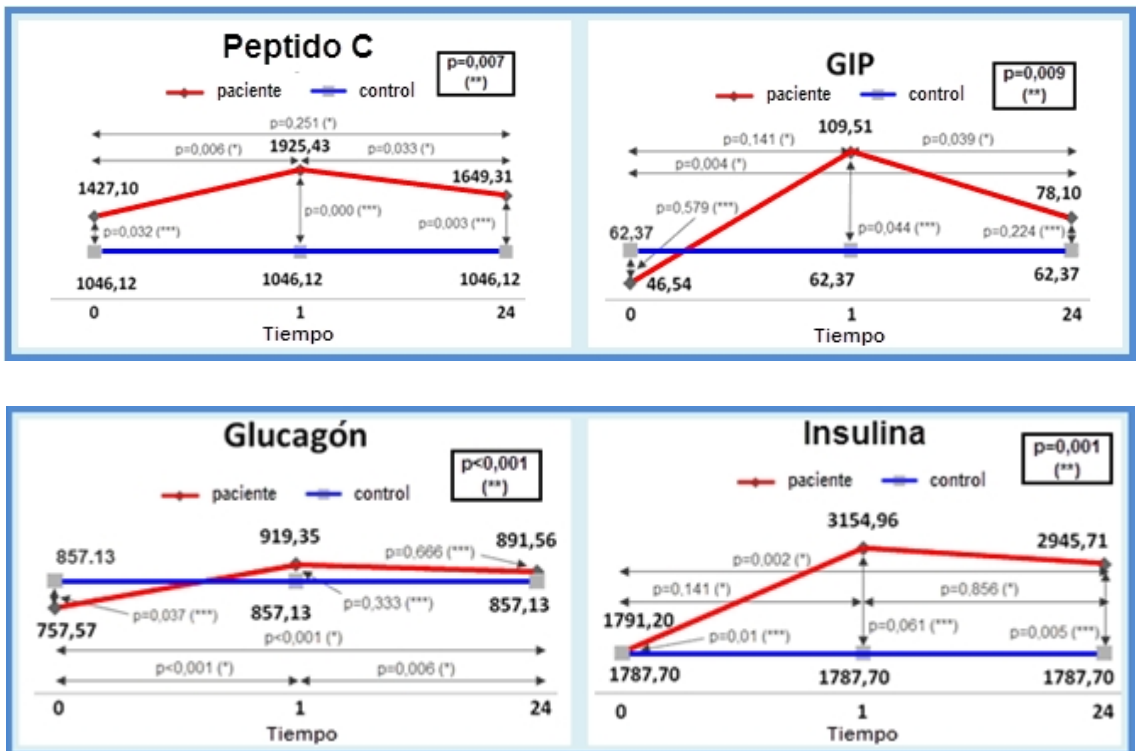
Tabla 8: Distribución de las principales variables demográficas y clínicas, y de los niveles basales de los biomarcadores.

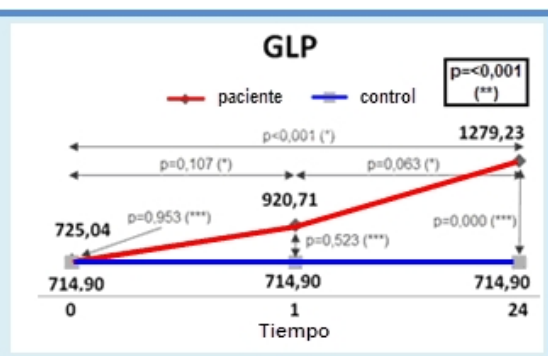
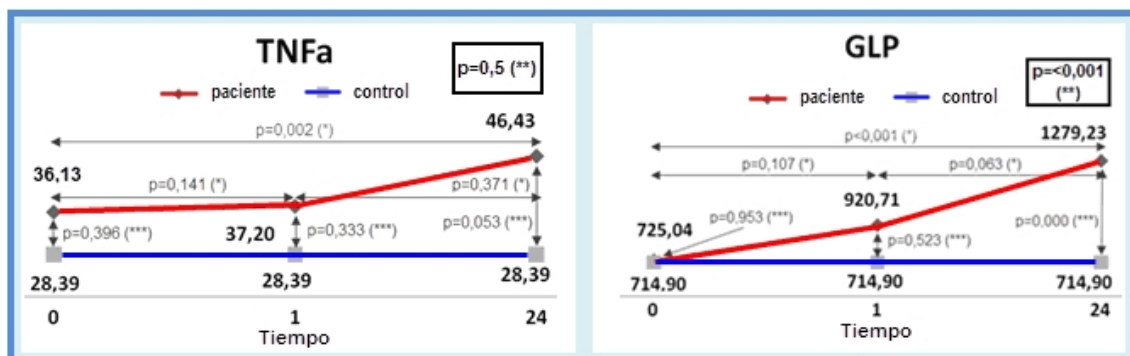
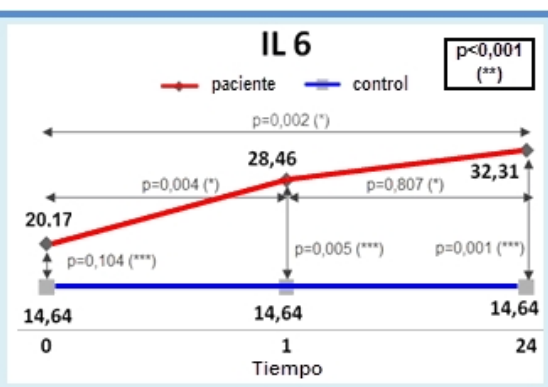
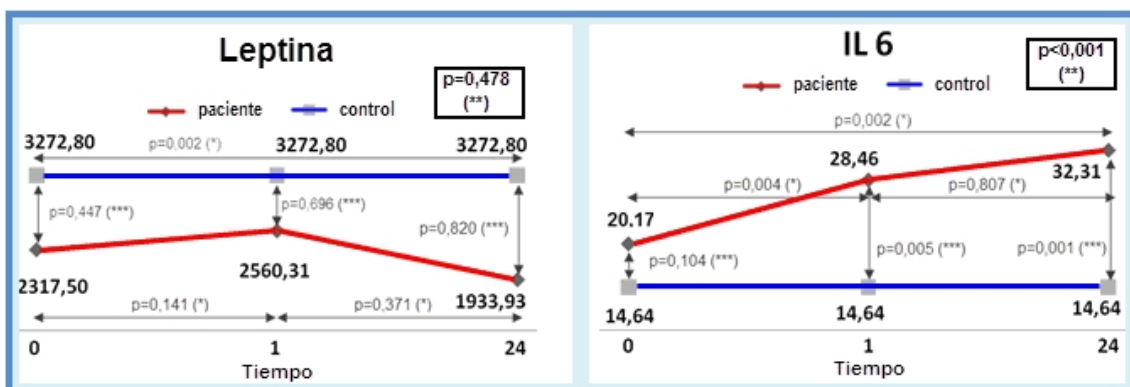
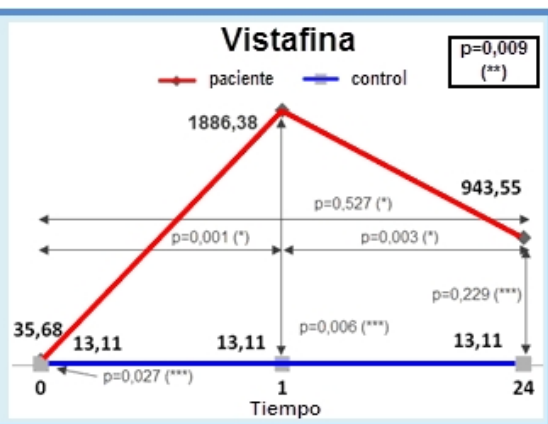
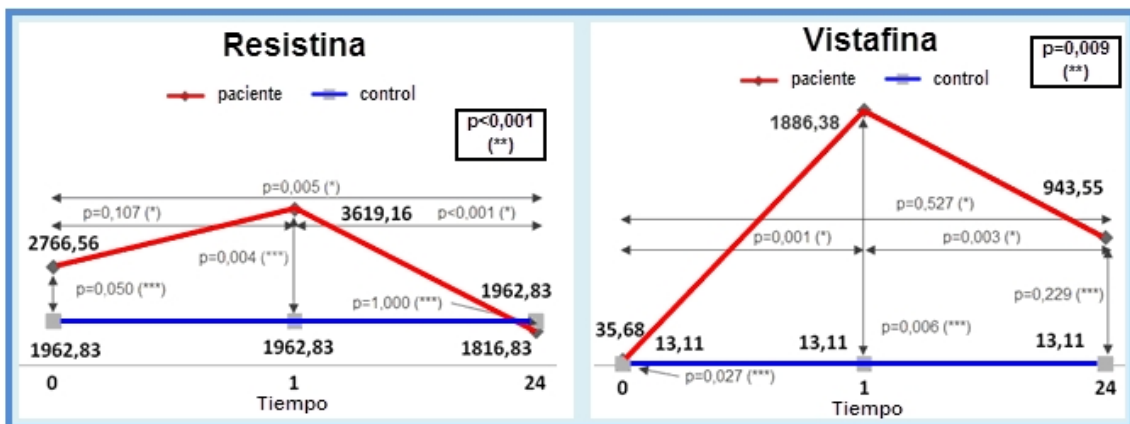
4.2 PERFIL TEMPORAL DE LOS BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Los niveles de las moléculas relacionadas con la resistencia a la insulina, fueron superiores en el grupo de los pacientes frente al grupo

control, en la mayoría de los tiempos estudiados, y con excepción de la leptina.

Respecto a la variación de los biomarcadores durante las primeras 24 horas, la mayoría de las moléculas experimentaron un incremento progresivo a lo largo de las 24 horas (grelina, GLP1, IL6 y TNF α), algunas de ellas mostrando un pico en la primera hora y después un descenso en las siguientes 23 horas (péptido-C, GIP, glucagón, insulina, leptina, resistina y visfatina). El perfil temporal de estos biomarcadores está representado en la figura 17.





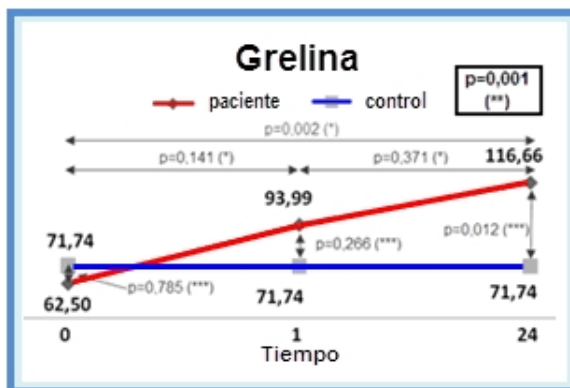


Figura 17: Perfil temporal de los biomarcadores. Las líneas rojas muestran la variación en la concentración de los biomarcadores en las primeras 24 horas en el grupo de pacientes, frente a las líneas azules que representan los controles sanos.

* p valor para la comparación de la concentración en cada tiempo con los demás tiempos, determinado mediante el test de Wilcoxon en el grupo de pacientes.

** p valor global para la variación de la concentración de los biomarcadores en las primeras 24 horas, determinado mediante el test de Friedman en el grupo de pacientes.

*** p valor para la comparación de los niveles de los biomarcadores entre el grupo de pacientes y el grupo control.

No encontramos ningún tipo de correlación entre los valores basales de ninguna molécula y la glucemia pre-tPA. Respecto a la glucemia a las 24 horas, se encontraron correlaciones significativas entre el GIP a las 24 horas ($r=-0.42$, $p=0.006$) (Figura 18), péptido-C a las 24 horas ($r=-0.35$, $p=0.02$), grelina a las 24 horas ($r=-0.34$, $p=0.03$), GLP1 a las 24 horas ($r=-0.43$, $p=0.006$), resistina a la 1 hora ($r=0.37$, $p=0.01$) y el incremento de glucagón en las primeras 24 horas ($r=0.36$, $p=0.02$).

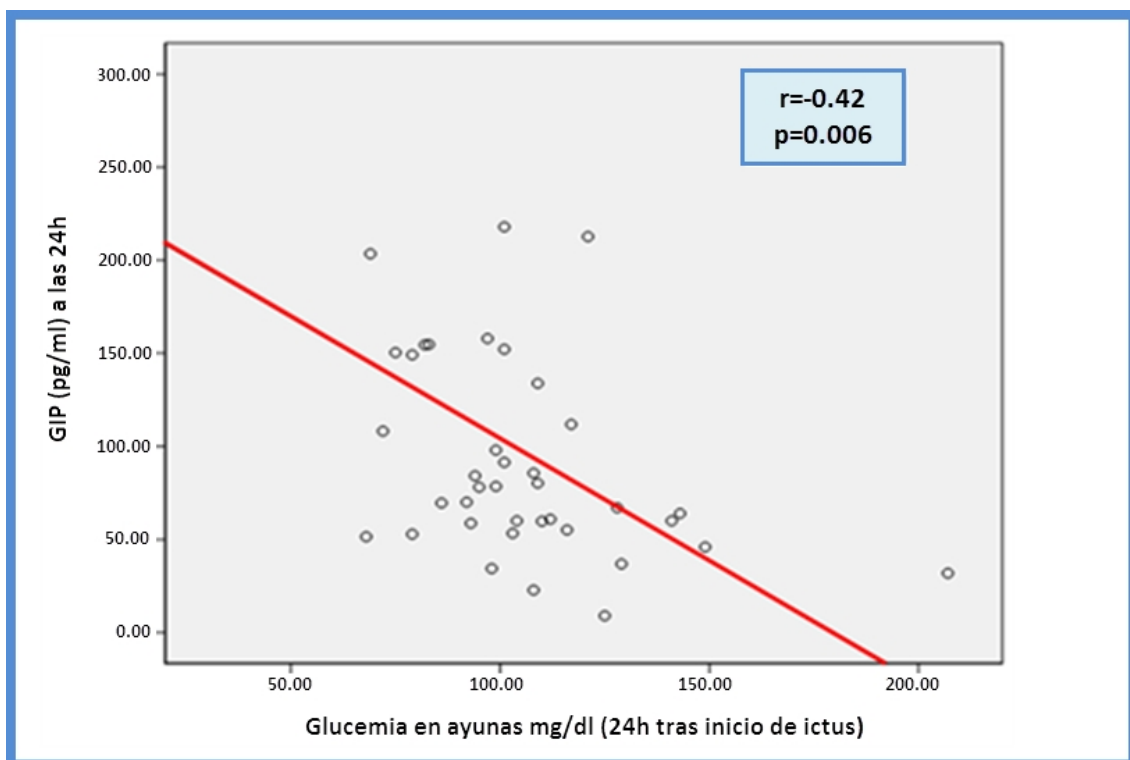


Figura 18: Correlación entre el GIP a las 24 horas y la glucemia a las 24 horas.

4.3 EVOLUCIÓN FUNCIONAL A LOS TRES MESES

4.3.1 RESISTENCIA A LA INSULINA, MEDIANTE EL ÍNDICE DE HOMA, Y PRONÓSTICO A LARGO PLAZO

En el primero de los trabajos, del total de los pacientes estudiados 34 (31.2%) tenían un mRs >2. El índice de HOMA fue superior en el grupo de mal pronóstico (1.66 [95% CI 1.08-2.73]) frente al grupo con buen pronóstico funcional al tercer mes (1.29 [95% CI 0.81-1.88]; $p=0.02$). La probabilidad de

buen pronóstico funcional al tercer mes decreció gradualmente con el incremento de los terciles de HOMA (Figura 19).

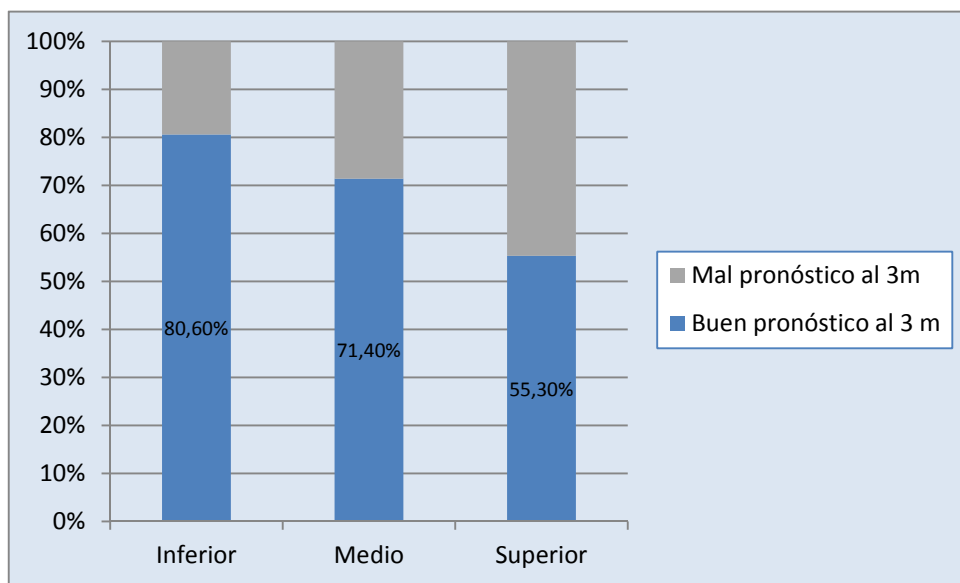


Figura 19: Porcentaje de buen pronóstico en función de los terciles de HOMA.

En un modelo de regresión logística ajustado por edad, NIHSS basal, glucemia pre-tPA y ASPECTS, el tercil superior de HOMA se asoció de forma independiente con mal pronóstico comparado con el tercil inferior (OR 8.54 [95% CI 1.67-43.55]; $p=0.01$, como se muestra en la tabla 9.

HOMA-IR Terciles	OR ratio para mal pronóstico	p
Tercil inferior HOMA<1.03	Referencia	
Tercil medio HOMA 1.03-1.71	OR 2.965 [0.61-14.4]	0.178

Tercil superior HOMA<1.71	OR 8.544 [1.67-43.35]	0.01
------------------------------	-----------------------	-------------

Tabla 9: Terciles de HOMA y pronóstico funcional a largo plazo. Los resultados muestran análisis multivariado ajustado por edad, NIHSS basal, glucemia pre-TPA y ASPECTS, para el pronóstico a largo plazo asociado al incremento de los terciles de HOMA, empleando el tercil inferior como referencia.

Un análisis bivariado identificó al sexo femenino ($p=0.026$), la edad ($p=0.034$), historia de DM ($p=0.005$), elevado NIHSS al ingreso ($p<0.001$) y niveles de plaquetas ($p=0.049$) como las variables significativamente asociadas con mal pronóstico funcional al tercer mes, como se refleja en la tabla 10.

VARIABLE	Buen pronóstico al tercer mes (n=75)	Mal pronóstico al tercer mes (n=34)	p
Sexo, mujer	27 (36%)	20 (55.8%)	0.026
Edad	69.46±11.4	74.41±10	0.034
Fumador activo últimos 5 años	19 (25.3%)	9 (26.5%)	0.900
Hábito enólico	7 (9.3%)	2 (5.9%)	0.544
HTA	46 (61.3%)	22 (64.7%)	0.736
DM	4 (5.3%)	8 (23.5%)	0.005
Hipercolesterolemia	32 (42.7%)	13 (38.2%)	0.663
Trat. Previo con aspirina	21 (28.0%)	8 (23.5%)	0.625
Trat. Previo con clopidogrel	5 (6.7%)	0 (0%)	0.123

Trat. Previo con estatina	21 (28%)	9 (26.5%)	0.868
Clasificación etiológica			0.443
CE	33 (44%)	18 (52.9%)	
ATH	16 (21.3%)	9 (26.5%)	
IND	20 (26.7%)	7 (20.6%)	
Lacunar	5 (6.7%)	0 (0%)	
Otros	1 (1.3%)	0 (0%)	
NIHSS basal	9.81 (5-13)	19 (12.50-22)	<0.001
Glucemia pre-tPA, mg/ dL	105.14±21.99	112.94±20.56	0.083
Leucocitos, x10 ³ /μl	7520 (6220-8760)	8600 (6452.5-10260)	0.680
Plaquetas, x10 ³ /μl	193000 (162500-232000)	214000 (191500-257000)	0.049
TAS basal, mm Hg	145.46±24.13	153.0±22.7	0.127
TAD basal, mm Hg	78.74±13.30	77.76±15.70	0.737
Temperatura	35.74±0.60	35.71±0.59	0.858
ASPECTS	10 (10-10)	10 (8.5-10)	0.267

Tabla 10: Resultados del análisis bivariado de las variables asociadas con mal pronóstico funcional a largo plazo.

Tras realizar el ajuste por aquellas variables con $p < 0.1$ en el análisis bivariado, el hecho de pertenecer al tercil superior de HOMA resistía como variable predictora de mal pronóstico al tercer mes (OR 3.31 [95% CI 1.17-9.36]; $p=0.024$). Otras variables independientes de mal pronóstico fueron edad y NIHSS basal.

4.3.2 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y PRONÓSTICO A LARGO PLAZO

En el segundo de los trabajos, tres meses después del ictus, 24 (47%) pacientes tuvieron un buen pronóstico. El análisis bivariado, que se muestra en la tabla 11, identificó un NIHSS elevado ($p < 0.001$), menor ASPECTS basal ($p = 0.002$) y elevada TAS ($p = 0.02$) como significativamente asociados con mal pronóstico funcional al tercer mes.

VARIABLE	Buen pronóstico 3m (n=24)	Mal pronóstico 3m (n=27)	p
Sexo, mujer	13 (54.16%)	19 (70.37%)	0.23
Edad	76.54±8.56	74.22±9.33	0.36
Fumador	5 (20.83%)	6 (22.22%)	0.90
Alcohol	1 (4.16%)	3 (11.11%)	0.24
HTA	15 (62.5%)	17 (62.96%)	0.26
DM	1 (4.16%)	5 (18.51%)	0.11
Hipercolesterolemia	7 (29.16%)	8 (29.62%)	0.97
TOAST categoría			0.12
CE	8 (33.33%)	16 (59.25%)	
ATH	5 (20.83%)	5 (18.51%)	
IND	11 (45.83%)	5 (18.51%)	
Otros	0 (0%)	1 (3.70%)	
NIHSS basal	10 (6-14)	19 (15-22)	<0.001
Glucemia Pre-bolus, mg/dL	111.83±24.28	125.18±30.18	0.091
Glucemia 24h basal,mg/dL	94.50±23.01	120.22±38.88	0.50

Leucocitos, x103/ μ l	7870 (6430-8680)	8730 (6290-9800)	0.32
Plaquetas, x103/ μ l	197000(166500-219500)	193000(158000-230000)	0.96
TAS, mm Hg	150.58 \pm 16.6	155.37 \pm 17.68	0.32
TAD, mm Hg	76.58 \pm 11.14	83.25 \pm 9.48	0.02
ASPECTS	10 (8-10)	8 (7-9)	0.002

Tabla 11: Análisis bivariado de variables basales asociadas con pronóstico funcional al tercer mes.

La concentración de los biomarcadores, analizados como variables continuas, que se asociaron con el pronóstico al tercer mes en el análisis bivariado fueron: GIP-24h, resistina-1h, visfatina-1h, la variación de GIP, insulina y leptina en las primeras 24 horas y el incremento de la visfatina a la hora. Sin embargo esta asociación no resistía el ajuste por las variables con $p < 0.1$ en el análisis bivariado (Tabla 12).

MOLECULA	OR	OR CRUDA 95% CI	P	OR	OR AJUSTADA 95% CI	P
Péptido C_0h	1.64	0.15-17.13	0.67			
Péptido C_1h	5.41	0.24-121.57	0.28			
Péptido C_24h	3.09	0.086-111.26	0.53			
Grelina_0h	0.53	0.16-1.74	0.30			
Grelina_1h	1.19	0.23-6.06	0.82			
Grelina_24h	2.23	0.17-28.25	0.53			

GIP_0h	0.89	0.29-2.68	0.83			
GIP_1h	2.32	0.49-11.05	0.28			
GIP_24h	15.53	1.05-227.73	0.045	89.1	0.65-12189.72	0.07
GLP_0h	1.65	0.39-6.97	0.49			
GLP_1h	0.81	0.13-5.05	0.82			
GLP_24h	1.23	0.06-22.80	0.88			
Glucagón_0h	1.47	0.03-61.61	0.83			
Glucagón_1h	24.50	0.048-12469.20	0.31			
Glucagón_24h	21.65	0.002-260807.6	0.52			
Insulina_0h	0.62	0.21-1.81	0.38			
Insulina_1h	0.91	0.19-4.29	0.91			
Insulina_24h	1.74	0.13-21.96	0.66			
Leptina_0h	1.70	0.46-6.30	0.42			
Leptina_1h	0.78	0.13-4.56	0.78			
Leptina_24h	0.58	0.15-2.23	0.43			
Resistina_0h	1.52	0.63-3.63	0.34			
Resistina_1h	3.16	0.71-14.04	0.12	1.62	0.19-13.71	0.65
Resistina_24h	1.64	0.19-13.62	0.64			
Visfatina_0h	1.06	0.60-1.85	0.83			
Visfatina_1h	1.58	0.91-2.71	0.09	2.17	0.86-5.48	0.10
Visfatina_24h	0.99	0.57-1.71	0.97			
IL6_0h	0.48	0.12-1.88	0.29			
IL6_1h	0.44	0.06-3.03	0.40			
IL6_24h	0.25	0.01-3.94	0.32			
TNF α _0h	0.60	0.17-2.05	0.41			

TNF α _1h	0.55	0.11-2.71	0.46			
TNF α _24h	0.60	0.03-0.40	0.72			
Péptido C (0h-1h)	1.80	0.17-18.86	0.62			
Péptido C (0h-24h)	3.84	0.24-61.24	0.34			
Grelina (0h-1h)	1.52	0.52-4.43	0.44			
Grelina (0h-24h)	2.06	0.57-7.45	0.26			
GIP (0h-1h)	1.67	0.53-5.24	0.37			
GIP (0h-24h)	2.50	0.66-9.39	0.17	6.47	0.53-78.62	0.14
GLP1 (0h-1h)	0.63	0.16-2.47	0.50			
GLP1 (0h-24h)	1.41	0.15-13.24	0.76			
Glucagón (0h-1h)	4.61	0.053-398.79	0.50			
Glucagón (0h-24h)	10.07	0.031-3275.37	0.43			
Insulin (0h-1h)	0.99	0.24-4.07	0.99			
Insulin (0h-24h)	3.44	0.50-23.28	0.20	7.01	0.31-158.39	0.22
Leptina (0h-1h)	0.51	0.10-2.65	0.42			
Leptina (0h-24h)	0.25	0.03-1.81	0.17	0.90	0.06-12.01	0.93
Resistina (0h-1h)	1.52	0.63-3.63	0.34			
Resistina (0h-24h)	0.76	0.27-2.17	0.61			
Visfatina (0h-1h)	1.51	0.88-2.57	0.12	2.53	0.93-6.85	0.06
Visfatina (0h-24h)	0.89	0.52-1.53	0.69			
IL6 (0h-1h)	1.10	0.18-6.57	0.91			
IL6 (0h-24h)	0.89	0.52-1.53	0.69			
TNF (0h-1h)	0.61	0.13-2.80	0.52			
TNF (0h-24h)	1.94	0.43-8.59	0.38			

Tabla 12: Análisis de regresión y buen pronóstico al tercer mes.

Entre las moléculas que mostraban una $p \leq 0.1$ en el modelo multivariado de regresión logística ajustado, únicamente el GIP-1h, GIP-24h y la visfatina-1h mostraron un AUROC por encima de 0.6. Un valor de 109.5 pg/ml para el GIP-1h y de 82.19 pg/ml para el GIP-24h emergieron como los mejores valores de corte ((71% sensibilidad; 70% especificidad) (61% sensibilidad; 77% especificidad)) respectivamente. Valores de GIP a la hora y a las 24 horas por encima de los valores de corte seleccionados, emergieron como predictores independientes de buen pronóstico (OR 13.78 [95% CI 1.38-137.31], $p=0.02$ y OR 28.46 [95% CI 1.9-739.82], $p=0.04$, respectivamente, siendo esta asociación independiente de los niveles de glucemia al ingreso y a las 24 horas. La figura 20 muestra la variación del GIP atendiendo a los subgrupos de pacientes en función del pronóstico al tercer mes.

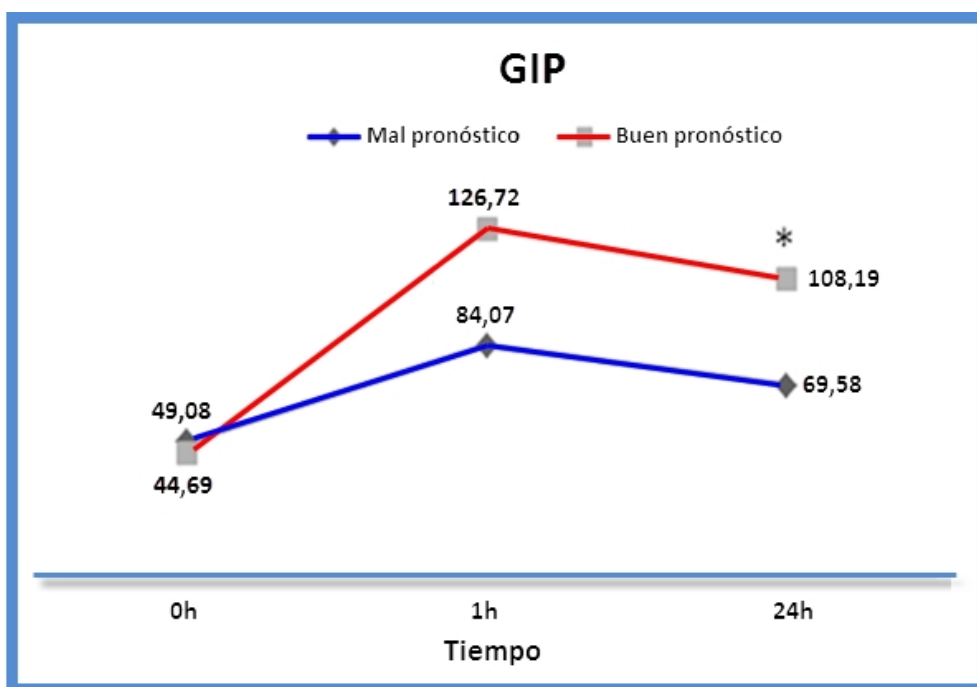


Figura 20: Variación del GIP atendiendo a los distintos subgrupos de pronóstico al 3m.

4.4 RESISTENCIA A LA RECANALIZACIÓN ARTERIAL

4.4.1 RESISTENCIA A LA INSULINA, MEDIANTE EL ÍNDICE DE HOMA, Y RESISTENCIA A LA RECANALIZACIÓN ARTERIAL A LAS 24 HORAS TRAS TPA.

En el primero de los trabajos se realizó estudio neurosonológico de control a las 24 horas en 89 de los 109 pacientes incluidos en el estudio. Observamos resistencia a la recanalización arterial en 19 (21.3%) de ellos. El índice de HOMA fue significativamente superior en aquellos pacientes con persistencia de la oclusión arterial a las 24 horas después del tPA: OR 1.87 [95% CI 1.19-3.6] vs 1.33 [0.8-2.00], $p=0.035$. El hecho de pertenecer al tercil superior de HOMA se asoció con una persistencia de la oclusión arterial después del tratamiento trombolítico. La probabilidad de resistencia a la recanalización arterial aumentó gradualmente con el aumento de los terciles de HOMA (figura 21).

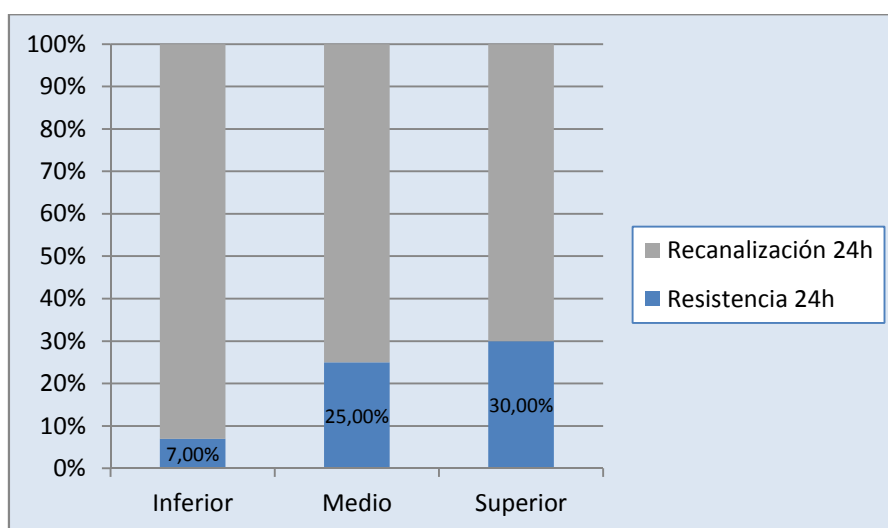


Figura 21: Porcentaje de resistencia a la recanalización a las 24 horas en función de los terciles de HOMA

En un modelo de regresión logística ajustado por edad, NIHSS basal, glucemia prebolus y ASPECTS, se encontró que el hecho de pertenecer al tercil superior de HOMA, comparado con el tercil inferior, suponía 8 veces mayor probabilidad de presentar resistencia a la recanalización arterial después del tratamiento con trombolisis iv (OR 8.2 [95% CI 1.23-54.44], $p=0.029$).

4.4.2 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y RESISTENCIA A LA RECANALIZACIÓN ARTERIAL A LAS 2 HORAS TRAS TPA.

En el segundo trabajo se realizó estudio neurosonológico de control a las 2 horas en 41 de los 52 pacientes incluidos. La recanalización arterial precoz se observó en 15 (36%) de los pacientes. No encontramos, sin embargo ningún tipo de asociación entre la concentración de las moléculas relacionadas con la resistencia a la insulina y la probabilidad de recanalización arterial en un modelo de regresión logística (datos no mostrados).

4.5 VOLUMEN DE LA HIPODENSIDAD

4.5.1 RESISTENCIA A LA INSULINA, MEDIANTE EL ÍNDICE DE HOMA, Y VOLUMEN DE LA HIPODENSIDAD

Los pacientes que pertenecían al tercil superior de HOMA tuvieron una mayor tendencia a presentar un mayor volumen del infarto en el TC de control de las 24 horas, aunque esta tendencia no alcanzó la significación

estadística (48.1 ± 83.4 cc en el tercil superior vs. 24.83 ± 44.12 cc en el resto de los terciles; $p=0.061$).

4.5.2 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y VOLUMEN DE LA HIPODENSIDAD.

La mediana del volumen del infarto medida en el TC de control a las 24 horas en la muestra de pacientes del segundo trabajo fue de 28.8cc (4.43-79cc). En un análisis de regresión lineal se encontró que NIHSS ($p<0.001$), ASPECTS ($p<0,001$), grelina-1h ($p=0.10$), GLP1-1h ($p=0.06$), IL6-1h ($p=0.10$) y el incremento de leptina en las primeras 24 horas ($p=0.006$), se asociaban con el volumen de la hipodensidad (tabla 13).

VARIABLE	B	B CRUDA 95% CI	P
Sexo, femenino	18.31	-23.46-60.10	0.38
Edad	-0.27	-2.60-2.06	0.81
Fumador activo últimos 5 años	16.31	-33.07-65.70	0.51
Enolismo	-35.70	-110.59-39.18	0.34
Historia de HTA o diagnóstico en el ingreso	-4.74	-47.21-37.72	0.82
DM	-15.79	-84.03-52.45	0.64
Hipercolesterolemia	-31.38	-76.28-13.51	0.16
Categoría TOAST	-13.31	-34.12-7.51	0.20
NIHSS basalscore	6.16	3.42-8.89	<0.001
Glucemia prebolus, mg/dL	-0.08	-0.83-0.65	0.81

Leucocitos, $\times 10^3/\mu\text{l}$	0.003	-0.004-0.01	0.40
Plaquetas, $\times 10^3/\mu\text{l}$	0.005	0.00-0.00	0.75
TAS, mm Hg	0.09	-01.11-1.30	0.87
TAD, mm Hg	2.04	-0.15-3.93	0.15
ASPECTS	-30.47	-42.48--18.45	<0.001
Péptido C_0h	-7.07	-93.63-79.48	0.87
Péptido C_1h	62.49	-51.80-176.80	0.27
Péptido C_24h	31.32	-104.40-166.87	0.64
Grelina_0h	2.27	-40.07-44.61	0.91
Grelina_1h	40.29	-40.07-44.61	0.18
Grelina_24h	22.91	-73.89-119.72	0.63
GIP_0h	-15.70	-56.00-24.59	0.43
GIP_1h	4.78	-52.44-61.94	0.86
GIP_24h	-19.33	-100.45-61.78	0.63
GLP1_0h	6.40	-39.64-52.46	0.78
GLP1_1h	62.26	-3.98-128.51	0.06
GLP1_24h	32.26	-78.25-142.78	0.55
Glucagón_0h	-2.11	-140.20-135.98	0.97
Glucagón_1h	49.49	-183.25-282.24	0.67
Glucagón_24h	-30.03	-384.41-324.34	0.86
Insulina_0h	12.62	-22.72-47.96	0.47
Insulina_1h	43.53	-13.18-100.24	0.12
Insulina_24h	10.88	-85.67-107.44	0.82
Leptina_0h	-28.35	-74.27-17.56	0.22
Leptina_1h	3.70	-62.45-69.85	0.91

Leptina_24h	8.15	-44.34-60.60	0.75
Resistina_0h	9.06	-18.60-36.73	0.51
Resistina_1h	-26.27	-80.86-28.30	0.33
Resistina_24h	16.16	-60.65-92.73	0.67
Visfatina_0h	1.01	-19.86-21.88	0.92
Visfatina_1h	-5.52	-24.57-13.52	0.56
Visfatina_24h	-0.34	-21.73-21.04	0.97
IL6_0h	21.51	-23.18-63.22	0.33
IL6_1h	54.53	-12.28-121.36	0.10
IL6_24h	29.86	-86.18-145.91	0.60
TNF α _0h	8.91	-28.22-46.03	0.63
TNF α _1h	37.46	-18.74-93.67	0.18
TNF α _24h	40.67	-62.84-144.19	0.43
Péptido C (0h-1h)	43.42	-44.48-131.34	0.32
Péptido C (0h-24h)	46.43	-54.43-147.30	0.35
Grelina (0h-1h)	19.75	-20.05-59.55	0.32
Grelina (0h-24h)	5.01	-40.53-50.56	0.82
GIP (0h-1h)	23.06	-18.74-64.87	0.27
GIP (0h-24h)	18.54	-25.53-62.63	0.40
GLP1 (0h-1h)	15.85	-32.17-63.88	0.50
GLP1(0h-24h)	39.13	-46.19-124.45	0.35
Glucagón (0h-1h)	28.37	-140.52-197.26	0.73
Glucagón (0h-24h)	63.18	148.44-274.82	0.54
Insulina (0h-1h)	27.71	-25.82-81.25	0.30
Insulina (0h-24h)	-5.98	-44.40-32.43	0.75

Leptina (0h-1h)	39.76	-15.36-94.87	0.15
Leptina (0h-24h)	95.36	29.26-161.45	0.006
Resistina (0h-1h)	15.57	-44.96-13.82	0.29
Resistina (0h-24h)	-2.79	-41.15-35.56	0.88
Visfatina (0h-1h)	-6.34	-25.36-12.68	0.50
Visfatina (0h-24h)	-0.20	-21.04-21.45	0.98
IL6 (0h-1h)	25.21	-42.36-92.78	0.45
IL6 (0h-24h)	-13.01	-65.86-39.83	0.062
TNF α (0h-1h)	36.46	-11.80-84.73	0.13
TNF α (0h-24h)	1.14	-40.20-42.48	0.95

Tabla 13: Modelo de regresión lineal entre variables basales/biomarcadores de resistencia a la insulina y volumen de la hipodensidad.

En un análisis de regresión lineal ajustado por las variables con $p < 0.1$ en el análisis bivariado, se identificaron a la grelina-1h (B 46.25 [95% CI 2.34-90.16], $p=0.03$) y el incremento de la leptina en las primeras 24 horas (OR 58.27 [95% CI 6.32-110.22], $p=0.02$), como los biomarcadores de resistencia a la insulina que se asociaban de una forma independiente con un mayor volumen del infarto (tabla 14).

VARIABLE	B	B AJUSTADA 95% CI	P
Grelina_1h	46.25	2.34-90.16	0.03
Leptina (0h-24h)	58.27	6.32-110.22	0.02

Tabla 14: Regresión lineal ajustada de biomarcadores de resistencia a la insulina y volumen de la hipodensidad.

4.6 TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA SINTOMÁTICA

4.6.1 RESISTENCIA A LA INSULINA, MEDIANTE EL ÍNDICE DE HOMA, Y TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA SINTOMÁTICA

La distribución de la SICH en función de los terciles de HOMA está representada en la tabla 15. No se encontró ningún tipo de asociación estadísticamente significativa entre la resistencia a la insulina, medida mediante el índice de HOMA y la posibilidad de presentar SICH ($p=0.357$).

	HOMA tercil superior (n=38)	HOMA tercil medio (n=35)	HOMA tercil inferior (n=36)	p
SICH precoz	0 (0%)	2 (5.7%)	1 (2.8%)	0.329

Tabla 15. Transformación hemorrágica sintomática en función de los terciles de HOMA.

4.6.2 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA SINTOMÁTICA

En el segundo trabajo de investigación, 2 pacientes (3.8%) presentaron SICH. No se encontró ningún tipo de asociación estadísticamente significativa entre la concentración de los biomarcadores y la posibilidad de presentar SICH.

4.7 PRONÓSTICO A CORTO PLAZO (MEJORÍA NEUROLÓGICA PRECOZ) Y BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA

En el segundo trabajo, observamos como 21 (40.38%) de los pacientes experimentaron mejoría neurológica en las primeras 24 horas. La tabla 16 muestra el resultado del análisis bivariado de las variables basales asociadas a la mejoría neurológica precoz.

VARIABLE	Evolución precoz favorable		P
	Sí (n=21)	No (n=31)	
Sexo, femenino	12 (57.14%)	20 (55.8%)	0.59
Edad	74.33±9.66	76.09±8.41	0.48
Fumador activo últimos 5 años	4 (19.04)	7 (22.58%)	0.76
Enolismo	2 (9.52%)	2 (6.45%)	0.68
HTA	13 (61.90%)	19 (61.29%)	0.96
DM	1 (4.76%)	5 (16.12%)	0.20
Hipercolesterolemia	6 (28.57%)	9 (29.03%)	0.97
Clasificación etiológica			0.22
CE	7 (33.33%)	17 (54.83%)	
ATH	4 (19.04%)	6 (19.35%)	
IND	10 (4.76%)	7 (22.58%)	
Otros	0 (0%)	1 (3.22%)	
NIHSS basal	13 (9-18)	16 (9-21)	0.51
Glucemia prebolus, mg/dL	121.95±24.44	117.12±30.19	0.54

Leucocitos, $\times 10^3/\mu\text{l}$	8110 (5957-8832)	8320 (6430-9800)	0.30
Plaquetas, $\times 10^3/\mu\text{l}$	187000(149500-209000)	203000(176000-254000)	0.04
TAS, mm Hg	148.95 \pm 15.94	156.45 \pm 17.55	0.12
TAD, mm Hg	76.66 \pm 11.37	82.22 \pm 9.72	0.06
ASPECTS	9 (8-10)	8 (7-10)	0.15

Tabla 16: Análisis bivariado de las variables basales asociadas con la mejoría neurológica precoz.

En un modelo de regresión logística ajustado por las variables basales significativas del bivariado de acuerdo a la tabla anterior, se identificó al GIP (OR 4.47 [95% CI 1.08-18.51], $p=0.03$), IL6 (0h-1h) (OR 0.06 [95% CI 0.005-0.73], $p=0.02$), y TNF α (0h-1h) (OR 0.13 [95% CI 0.02-0.91], $p=0.04$), como los biomarcadores asociados de forma significativa con la mejoría neurológica precoz.

MOLECULA	OR	OR CRUDA 95% CI	P	OR	OR AJUSTADA 95% CI	P
Péptido C_0h	4.03	0.34-47.52	0.26			
Péptido C_1h	1.22	0.05-25.14	0.89			
Péptido C_24h	1.45	0.04-50.00	0.83			
Grelina_0h	1.72	0.51-5.71	0.37			
Grelina_1h	0.52	0.09-2.81	0.45			

Grelina_24h	1.34	0.10-16.86	0.81			
GIP_0h	2.46	0.75-8.11	0.13	4.47	1.08-18.51	0.039
GIP_1h	1.58	0.34-7.20	0.55			
GIP_24h	3.62	0.36-35.78	0.27			
GLP1_0h	1.83	0.37-9.00	0.45			
GLP1_1h	0.56	0.09-3.53	0.53			
GLP1_24h	0.70	0.03-12.75	0.81			
Glucagón_0h	3.05	0.06-149.57	0.57			
Glucagón_1h	0.06	0.00-39.16	0.40			
Glucagón_24h	0.37	0.001-59787.04	0.69			
Insulina_0h	1.87	0.55-6.34	0.31			
Insulina_1h	0.52	0.10-2.59	0.43			
Insulina_24h	1.03	0.08-12.82	0.97			
Leptina_0h	1.99	0.52-7.62	0.31			
Leptina_1h	1.51	0.26-8.77	0.64			
Leptina_24h	0.99	0.27-3.64	0.99			
Resistina_0h	0.95	0.45-2.01	0.90			
Resistina_1h	0.52	0.12-2.28	0.39			
Resistina_24h	0.51	0.06-3.90	0.52			
Visfatina_0h	0.74	0.41-1.33	0.32			

Visfatina_1h	0.90	0.54-1.49	0.69			
Visfatina_24h	0.86	0.49-1.49	0.59			
IL6_0h	2.05	0.50-8.40	0.31			
IL6_1h	0.20	0.023-1.85	0.15			
IL6_24h	0.26	0.01-4.28	0.34			
TNF α _0h	2.27	0.59-8.74	0.23			
TNF α _1h	0.35	0.06-2.05	0.24			
TNF α _24h	0.44	0.08-2.21	0.32			
Péptido C (0h-1h)	0.28	0.02-3.28	0.31			
Péptido(0h-24h)	0.29	0.01-4.59	0.38			
Grelina (0h-1h)	0.54	0.17-1.68	0.29			
Grelina (0h-24h)	0.83	0.25-2.78	0.77			
GIP (0h-1h)	0.57	0.17-1.83	0.34			
GIP (0h-24h)	0.61	0.18-2.04	0.42			
GLP1 (0h-1h)	0.40	0.08-1.89	0.25			
GLP1 (0h-24h)	0.95	0.10-8.99	0.97			
Glucagón (0h-1h)	0.01	0.00-3.34	0.13	0.002	0.00-1.34	0.06
Glucagón (0h-24h)	0.74	0.003-187.62	0.91			
Insulina (0h-1h)	0.29	0.06-1.36	0.12	0.28	0.05-1.42	0.12
Insulina (0h-24h)	0.63	0.18-2.22	0.48			

Leptina (0h-1h)	0.20	0.02-1.79	0.15	0.19	0.01-2.27	0.19
Leptina (0h-24h)	0.14	0.01-1.27	0.08			
Resistina (0h-1h)	0.87	0.39-1.92	0.74			
Resistina (0h-24h)	1.15	0.43-3.07	0.76			
Visfatina (0h-1h)	1.01	0.61-1.66	0.96			
Visfatina (0h-24h)	0.95	0.55-1.63	0.86			
IL6 (0h-1h)	0.09	0.01-0.87	0.03	0.06	0.005-0.73	0.02
IL6 (0h-24h)	0.40	0.06-2.37	0.31			
TNF α (0h-1h)	0.15	0.02-0.93	0.04	0.13	0.02-0.91	0.04
TNF α (0h-24h)	0.44	0.08-2.21	0.32			

Tabla 17: Modelo de regresión logística cruda y ajustada de los biomarcadores de resistencia a la insulina y la mejoría neurológica precoz.

Entre aquellas moléculas que mostraban una $p \leq 0.1$ en el modelo de regresión logística ajustado, solamente el GIP basal y el GIP a las 24 horas presentaban AUROC por encima de 0.6. Un valor de 84.91 pg/ml para el GIP a las 24 horas emergió como el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad (55% y 72% respectivamente). Valores de GIP a las 24 horas por encima de este punto de corte se asociaron de forma independiente con la mejoría neurológica precoz (OR 5.76 [95% CI 1.27-26.16], $p=0.02$).



SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5 SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESISTENCIA A LA INSULINA Y PRONÓSTICO FUNCIONAL A LARGO PLAZO

El primero de los trabajos confirma que la resistencia a la insulina, el mecanismo fisiopatológico subyacente al SM, se asocia de forma independiente a un peor pronóstico funcional a largo plazo en los pacientes con ictus isquémico tratados con tPA iv. Observamos como la probabilidad de un alcanzar un buen pronóstico funcional al tercer mes decrecía de forma gradual con el incremento de los terciles de HOMA.

Además observamos que los pacientes que pertenecían al tercil superior de HOMA tenían al menos 8 veces una mayor probabilidad de tener un peor pronóstico que aquellos que pertenecían al tercil inferior; siendo la variable resistencia a la insulina una variable independiente de mal pronóstico funcional al tercer mes.

Este trabajo fue diseñado para dar un paso más respecto a los previos^{221, 222} que trataban de estudiar el pronóstico de los pacientes con SM e ictus isquémicos tratados con tPA iv. Sin embargo estos trabajos estaban basados en una definición clínica del SM, que como ya hemos comentado en la introducción de esta tesis está sujeta a diversas críticas, y no en una medida directa de la resistencia a la insulina. Por lo tanto este primer trabajo ha sido diseñado para tratar de testar la misma hipótesis de una forma más sólida, empleando en este caso el índice de HOMA para cuantificar de una forma directa la resistencia a la insulina, mediante un modelo que ya ha demostrado previamente en estudios epidemiológicos su potencial para

medir la resistencia a la insulina y la funcionalidad de las células β del páncreas²³³.

5.2 RESISTENCIA A LA INSULINA Y RESISTENCIA A LA RECANALIZACIÓN ARTERIAL

En el primero de los trabajos hemos demostrado que la resistencia a la insulina se asocia de forma independiente a una mayor persistencia de la oclusión arterial a pesar del tratamiento con tPA endovenoso en los pacientes con ictus isquémico.

Estudios previos han resaltado la importancia de alcanzar la recanalización arterial lo más precozmente posible para obtener un mejor pronóstico en los pacientes con ictus isquémico³⁶.

En nuestra primera publicación, observamos cómo un 21.3% de los pacientes tenían una oclusión arterial persistente tras 24 horas de haber recibido tratamiento con trombolisis iv. Este grupo de pacientes con ausencia de recanalización arterial, tenían una mayor resistencia a la insulina. La probabilidad de una mayor resistencia a la recanalización arterial aumentaba gradualmente con el incremento de los terciles de HOMA.

El hecho de pertenecer al tercil superior de HOMA, comparado con el hecho de pertenecer al tercil inferior, supone unas 8 veces mayor probabilidad de resistencia a la recanalización arterial a las 24 horas del tratamiento trombolítico.

La resistencia a la insulina, puede antagonizar el efecto de la trombolisis sistémica por varios mecanismos. En primer lugar, los pacientes

con una mayor resistencia a la insulina tienen un incremento en los niveles de inhibidores de la fibrinólisis, tales como PAI-1, lo cual refleja una alteración en la fibrinólisis endógena²¹⁶. En segundo lugar, la resistencia a la insulina, puede afectar a la estructura del trombo, haciendo al trombo más denso y resistente a la lisis. Así estudios en humanos han demostrado como la densidad de los trombos aumenta de forma progresiva con el incremento en el número de los componentes del SM²¹⁸. Además los trombos que provienen de pacientes con SM, tienen fibras más gruesas y un tiempo de lisis más prolongado que aquellos de individuos sin resistencia a la insulina²¹⁹.

Como ha quedado reflejada en nuestra introducción, la resistencia a la insulina puede promover varias condiciones que pueden contribuir a empeorar la respuesta al tratamiento trombolítico del infarto cerebral, tales como aumento de la activación plaquetaria, la disfunción endotelial o la presencia de un estado proinflamatorio²¹⁵.

En el segundo de los trabajos fallamos en demostrar asociación estadísticamente significativa entre los biomarcadores de resistencia a la insulina y la ausencia de recanalización arterial. Sin embargo, el número de pacientes que cumplieron el protocolo neurosonológico fue escaso (41/52 pacientes), pudiendo explicar este tamaño muestral la ausencia de significación.

Implicaciones

Los pacientes con ictus isquémicos, que tengan una mayor resistencia a la insulina, deberían ser considerados malos respondedores a las terapias de reperfusión iv, y por tanto quizás deberían ser enfocados hacia terapias de reperfusión más agresivas, tales como trombolisis intraarterial o trombectomía mecánica. Así mismo ante estos hallazgos nos planteamos si la

resistencia a la insulina se debería considerar una diana para nuevos tratamientos en fase aguda, conllevando por tanto la necesidad de manejar terapéuticamente la resistencia a la insulina de forma ultraprecoz.

5.3 RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y EL PRONÓSTICO INDEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE GLUCEMIA

Nuestros resultados, tratan de apoyar la idea de que la resistencia a la insulina, independientemente de los niveles de glucemia, puede ejercer un efecto deletéreo en el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico.

Se sabe que la hiperglucemia influye en la evolución desfavorable de los pacientes con ictus, a través de diversos mecanismos²³⁴. El diseño de nuestro primer trabajo, ha tratado de evitar desde un primer momento este potencial efecto confusor de la hiperglucemia, para lo cual se excluyeron pacientes con hiperglucemia >155mg/dl en el momento del ingreso (este punto de corte fue seleccionado de acuerdo a nuestros protocolos locales de manejo de los pacientes con ictus isquémicos, redactados conforme a las guías de American Diabetes Association's²²⁵ del control de la glucemia de los pacientes ingresados, así como en base a los resultados del estudio glycemia in acute stroke (GLIAS)²²⁴, en el cual se señalaba este punto de corte como el de mayor sensibilidad y especificidad en las primeras 48 horas para predecir un peor pronóstico.

A pesar de haber excluido pacientes con hiperglucemia al ingreso, demostramos que la resistencia a la insulina emergía como predictor independiente de mala respuesta a la trombolisis, después de ajustar por la

glucemia pre-tPA en un modelo de regresión logística. De acuerdo con nuestros hallazgos, estudios previos ya han demostrado que la hiperinsulinemia puede causar una alteración en la fibrinólisis independiente de los niveles de glucosa²²⁰. Estos resultados irían en la línea de que ambas, hiperglucemia e hiperinsulinemia pueden tener un efecto deletéreo independiente que podría contribuir a disminuir la eficacia de la terapia de fibrinólisis iv.

Esta cuestión acerca del efecto independiente de la resistencia a la insulina y la hiperglucemia sobre el pronóstico de los ictus, ha provocado incluso la publicación de una carta comentado nuestro primer trabajo²³⁵. Teniendo en cuenta los comentarios de Natarajan et al. acerca de la importancia de la glucemia en los primeros días sobre el pronóstico de los pacientes con ictus, nuestro grupo realizó un segundo análisis revisando las concentraciones de la glucosa y la insulina en las 24-48 horas en el grupo de pacientes con buen vs. mal pronóstico. Ambos parámetros fueron superiores en el grupo con peor respuesta a la trombolisis iv. Resaltamos que los niveles medios de glucosa en el grupo con peor pronóstico, estaban sólo modestamente elevados (124mg/dl), en la línea con la idea de que incluso moderados incrementos de glucemia pueden ser deletéreos. Realizamos así mismo un modelo de regresión logística independiente, en el que incluimos HOMA-IR, glucemia en ayunas e insulina, en el que encontramos que la asociación de HOMA-IR con un peor pronóstico, resulta más fuerte que la asociación con cada uno de los componentes individuales de HOMA-IR; apoyando la idea de que la resistencia a la insulina por sí misma puede ejercer un efecto deletéreo en el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico.

De todas formas, desde un punto de vista metodológico, resulta muy difícil poder aislar el potencial efecto de la resistencia a la insulina de los niveles de glucemia, dado que esta variable está incluida en la propia ecuación del HOMA-IR. Teniendo en cuenta esto, fue diseñado el segundo trabajo, con biomarcadores de la resistencia a la insulina.

5.4 PERFIL TEMPORAL EN FASE AGUDA DEL ICTUS DE LOS BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA

Cuando diseñamos el primer trabajo éramos conscientes, que debido a que las muestras sanguíneas empleadas para calcular HOMA-IR eran extraídas a las 24-48 horas después del ictus, tendríamos que asumir que los valores de resistencia a la insulina obtenidos pudiesen presentar alguna diferencia respecto a la condición preictus. No podíamos descartar del todo, que no estuviesen afectados por la fase aguda del ictus. Sin embargo, la media de nuestros valores de HOMA eran comparables o incluso algo menores que los encontrados en pacientes en fase crónica después de un ictus, lo cual iría en contra de una gran influencia de la fase aguda en los resultados de nuestro primer trabajo²³⁶.

El segundo trabajo fue sin embargo diseñado con la idea de encontrar algún biomarcador de resistencia a la insulina que no se modificase durante la fase aguda del infarto cerebral y que por tanto sirviese de indicador indirecto del estado de la resistencia a la insulina previo al evento isquémico. Sin embargo, la mayoría de los biomarcadores estudiados mostraron un incremento en sus niveles plasmáticos durante las primeras 24 horas después del ingreso, en respuesta a la fase aguda del ictus. La magnitud de este

cambio agudo en la concentración de los biomarcadores en respuesta a la isquemia cerebral, muestra una gran variedad en toda la muestra. Nuestra hipótesis es que estas diferencias observadas en el perfil temporal de las moléculas, podría estar influenciado por el estado pre-ictus de resistencia a la insulina. Además las asociaciones encontradas entre los biomarcadores de resistencia a la insulina y el pronóstico de los pacientes con ictus, las hemos descrito no para los niveles basales, sino para los cambios que experimentan las mismas en las primeras 24 horas.

5.5 NIVELES DE GIP Y PRONÓSTICO A CORTO Y LARGO PLAZO

En el segundo trabajo, concluimos que la concentración mayor de GIP en las primeras 24 horas, probablemente reflejando una mayor sensibilización a la insulina, se asoció a un mejor pronóstico a corto y largo plazo. Demostramos como unos niveles de GIP más elevados a la hora y a las 24 horas se asociaban con un mejor pronóstico a largo plazo, después del tratamiento con tPA iv. Además unos niveles más elevados de este biomarcador en su determinación basal y a las 24 horas, se asociaron con una mejoría precoz neurológica. GIP es una molécula que estimula la secreción de insulina en función de los niveles de glucosa. Su secreción está regulada principalmente por la presencia de nutrientes en el tracto gastrointestinal²³⁷, sin embargo la liberación de esta hormona en situaciones de estrés como la que pudiese suponer un ictus isquémico, no está suficientemente estudiada. Hay estudios animales que demuestran cómo el bloqueo químico de los receptores de GIP tiene como resultado una alteración en la secreción de insulina y la regulación de los niveles de glucosa²³⁸. En concordancia con

estos modelos animales, estudios en humanos han descrito una importante disminución de los niveles de esta molécula en pacientes diabéticos tipo 2²³⁹. Sin embargo poco se conoce acerca del papel del GIP en pacientes críticos y de su potencial contribución al desarrollo de hiperglucemia en situaciones de estrés²⁴⁰.

Describimos una correlación negativa entre los niveles de GIP a las 24 horas y los niveles de glucemia a las 24 horas, mostrando cómo aquellos pacientes con un menor incremento de GIP en las primeras 24 horas, tenían una mayor glucemia a las 24 horas. Como ya hemos comentado, la hiperglucemia es un importante predictor del pronóstico de los pacientes con ictus en general²⁴¹, así como en los pacientes con ictus tratados con terapias de reperfusión iv²³⁴. Así mismo, no sólo los niveles de glucemia al ingreso se asocian con el pronóstico de los pacientes con ictus, sino también la hiperglucemia observada en cualquier momento durante las primeras 48 horas^{224, 235}.

Tratando por tanto de explicar la asociación que hemos encontrado entre los niveles del GIP y el pronóstico, nuestra hipótesis es que la expresión de este biomarcador en el contexto de un ictus isquémico agudo, puede ser parte de la respuesta de fase aguda tratando de incrementar la sensibilidad de la insulina para reducir la hiperglucemia de estrés. Los pacientes con buen funcionamiento de este sistema serían capaces de mantener concentraciones normales o bajas de glucemia, sin embargo los pacientes con mayor resistencia a la insulina tendrían un funcionamiento deficiente, con menor expresión de moléculas sensibilizadoras de la insulina, lo que al final favorecería un peor control de la glucemia durante toda la fase aguda.

Implicaciones

Estudios futuros son necesarios para confirmar estos resultados, para tratar de conocer si el GIP es un mediador activo o simplemente un espectador inocente en la fase aguda del infarto cerebral. Si resulta que este biomarcador está activamente implicado en procesos que determinan el pronóstico de los ictus isquémicos agudos, el estudio de si su modulación terapéutica podría tener algún efecto clínico sería así mismo merecedor de futuras investigaciones.

5.6 OTROS BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y VARIABLES PRONÓSTICAS: LEPTINA, GRELINA, TNFA E IL-6

Como ya hemos señalado, los resultados más importantes los hemos descrito para el GIP, sin embargo otros resultados positivos han sido demostrados para otros biomarcadores de resistencia a la insulina: leptina, grelina, TNF α e IL6.

En nuestra serie de pacientes, un mayor incremento de los niveles de leptina en las primeras 24 horas, se asoció con un mayor volumen del infarto. Existen estudios previos en cultivos de células endoteliales humanas en los que la leptina potencia la expresión de PAI-1²⁴², o bien estudios in vivo en ratones que demuestran como la administración de leptina tiene efecto protrombótico²⁴³, o como este efecto protrombótico puede ser inhibido después de la administración de anticuerpos monoclonales que neutralicen la leptina²⁴⁴. En la línea de estos estudios también hay estudios humanos que han encontrado una asociación entre los niveles elevados de leptina y

disfunción endotelial¹³⁴. Sin embargo, todos estos estudios, al igual que los resultados de nuestra serie de pacientes, están en desacuerdo con investigaciones recientes en modelos en ratones de isquemia focal transitoria que han mostrado como la administración periférica de leptina disminuye el volumen del infarto mediante la reducción del estrés oxidativo y la apoptosis neuronal²⁴⁵.

Así mismo, niveles elevados de grelina a la hora se asocian con mayor volumen del infarto. Estos hallazgos están en discordancia con los resultados previos reportados en la literatura. En modelos animales de isquemia cerebral permanente se ha demostrado que el tratamiento con la grelina resulta en un descenso del tamaño del infarto y del déficit neurológico mediante la supresión de la inflamación, la actividad del nNOS y la apoptosis²⁴⁶. En estudios cardiacos en modelos animales²⁴⁷ y en humanos²⁴⁸, la grelina podría ser empelada como tratamiento para la insuficiencia cardiaca, mejorando la función del ventrículo izquierdo, así como la capacidad para el ejercicio. Por lo tanto, el papel de la grelina en los pacientes con isquemia cerebral, necesita ser clarificado con futuros trabajos.

Finalmente, respecto a las citoquinas inflamatorias, un incremento en los niveles de IL6 y TNF α durante la primera hora después del tratamiento trombolítico se asoció con un empeoramiento en la evolución neurológica precoz. Ambas citoquinas están elevadas en pacientes con resistencia a la insulina, reflejando por tanto la presencia de un estado proinflamatorio²⁴⁹. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado la asociación existente entre éstos y otros biomarcadores inflamatorios determinados durante las primeras 24 horas después de un ictus y la probabilidad de deterioro neurológico precoz²⁵⁰. Este estado proinflamatorio asociado con la resistencia a la insulina²⁵¹, entre otros mecanismos, puede

contribuir a empeorar el pronóstico del ictus en general así como la respuesta a la trombolisis iv.

5.7 LIMITACIONES

Estos trabajos de investigación presentan algunas limitaciones. El tamaño muestral de ambos trabajos es pequeño, aunque se trata de muestras altamente seleccionadas, y por tanto sus resultados necesitan ser confirmados en otra muestra. Recientemente ha sido presentada una tesis doctoral defendida por Laura Dorado Bouix (“Impacto del síndrome metabólico en la resistencia a la recanalización arterial y en el pronóstico de los pacientes con oclusión aguda de la arteria cerebral media tratados con activador tisular del plasminógeno”; Universidad Autónoma de Barcelona), en la que confirmaron la relación entre el SM y la resistencia a la recanalización arterial en una muestra prospectiva independiente de 234 pacientes similares.

En el primero de los trabajos, se empleó el índice de HOMA para cuantificar la resistencia a la insulina, y no el gold estándar que sería el clamp hiperinsulinemia-euglucemia, debido a las limitaciones prácticas que conlleva. Sin embargo, el método seleccionado se correlaciona muy bien con el gold estándar²³². En segundo lugar, las muestras de sangre en ayunas empleadas para el cálculo del índice de HOMA se obtuvieron durante las primeras 24 a 48 horas después del ictus. Por lo tanto debemos asumir que el índice de HOMA que hemos calculado, puede presentar algunas diferencias respecto al estado pre-ictus del paciente, debido a que no disponemos de

una cuantificación de la resistencia a la insulina previa al ictus. No podemos por tanto, descartar que nuestros resultados no estén influenciados por la fase aguda del ictus. Sin embargo la media de los valores que hemos obtenido para el índice de HOMA resultan similares o incluso menores que los reportados en la literatura en la fase crónica del ictus, lo cual estaría en contra de la posible influencia de la fase aguda del ictus en nuestros resultados²³⁶.

En el segundo trabajo, el estudio neurosonológico de control a las 2 horas para evaluar el estado de la oclusión arterial, no se pudo realizar en un número significativo de pacientes y quizá eso explique la ausencia de relación entre los biomarcadores de la resistencia a la insulina y la resistencia a la recanalización arterial. Así mismo, en este segundo trabajo, el panel de biomarcadores empleado, no incluye algunas moléculas relevantes como la adiponectina. De acuerdo con nuestra hipótesis principal, que relaciona los biomarcadores de resistencia a la insulina con el pronóstico del ictus, estudios preclínicos en modelos de isquemia en ratas²⁵² y ratones²⁵³, han demostrado una estrecha correlación entre la adiponectina y el tamaño del infarto cerebral. Además, la tasa de supervivencia a los 5 años después de un ictus isquémico, parece mayor en pacientes con menor nivel de adiponectina en las primeras 24 horas desde el inicio del ictus²⁵⁴. Por tanto la necesidad de encontrar un marcador que nos hable del grado previo de resistencia a la insulina sigue abierta.

Algunas de las líneas futuras de investigación, continuando con nuestro enfoque, y que podrían dar respuesta a parte de las limitaciones descritas para nuestro trabajo, serían:

- Investigación en modelos animales de isquemia focal con estas moléculas (especial atención al GIP), tratando de averiguar si alguna de ellas puede convertirse en diana terapéutica.
- Investigar el papel de la resistencia a la insulina en el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico sometidos a terapias de reperfusión endovasculares.
- Estudios clínicos dedicados a establecer el mejor régimen de control de la glucemia en el contexto de las terapias de reperfusión.
- Búsqueda de nuevos biomarcadores.



CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis son:

1. Una mayor resistencia a la insulina predice una peor respuesta al tratamiento trombolítico sistémico del infarto cerebral. Un mayor valor del índice de HOMA se asocia independientemente tanto a una mayor resistencia a la recanalización arterial, como a un peor pronóstico funcional a largo plazo de los pacientes con infarto cerebral agudo de la arteria cerebral media tratados con tPA endovenoso.

2. La concentración plasmática de la mayoría de las moléculas estudiadas relacionadas con la resistencia a la insulina, experimenta un incremento durante las primeras 24 horas de evolución del ictus. En consecuencia, la concentración inicial de las moléculas estudiadas no se comporta como un buen indicador del grado de resistencia a la insulina previo al ictus. La diferencia interindividual en la variación de la concentración plasmática de estas moléculas durante las primeras 24 horas, sí podría estar en relación con el estado de resistencia a la insulina del paciente, como vemos para el GIP.

3a. Una mayor concentración plasmática de GIP a las 24 horas del inicio del ictus se asocia a un mejor pronóstico de los pacientes a corto y a largo plazo. Un mayor incremento del GIP se asocia con un mejor control de la glucemia durante las primeras 24 horas.

3b. Un mayor incremento de la concentración de leptina en las primeras 24 horas y la concentración de grelina a la hora, se asocian con un mayor volumen del infarto. El incremento de IL6 y TNF α durante la primera hora después del tratamiento trombolítico se asocia con una peor evolución neurológica precoz.



BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Christou I, Alexandrov AV, Burgin WS, Wojner AW, Felberg RA, Malkoff M, Grotta JC. Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:1812-1816
2. Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, El-Mitwalli A, Grotta JC. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: Sonographic classification and short-term improvement. *Circulation*. 2001;103:2897-2902
3. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The national institute of neurological disorders and stroke rt-pa stroke study group. *N Engl J Med*. 1995;333:1581-1587
4. Higashida R, Furlan A, Roberts H, Tomsick T, Connors B, Barr J, Dillon W, Warach S, Broderick J, Tilley B, Sacks D. Trial design and reporting standards for intraarterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *J Vasc Interv Radiol*. 2003;14:S493-494
5. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grund M, Hacke W, Hennerici MG, Kaste M, Kuelkens S, Larrue V, Lees KR, Roine RO, Soine L, Toni D, Vanhooren G. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the safe implementation of thrombolysis in stroke-monitoring study (sits-most): An observational study. *Lancet*. 2007;369:275-282
6. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1317-1329
7. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo G, Sandercock P, Lindley RL, Cohen G. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: An updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012;379:2364-2372
8. Albers GW, Thijs VN, Wechsler L, Kemp S, Schlaug G, Skalabrin E, Bammer R, Kakuda W, Lansberg MG, Shuaib A, Coplin W, Hamilton S, Moseley M, Marks MP. Magnetic resonance imaging profiles predict clinical response to early reperfusion: The diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution (defuse) study. *Ann Neurol*. 2006;60:508-517
9. Davis SM, Donnan GA, Parsons MW, Levi C, Butcher KS, Peeters A, Barber PA, Bladin C, De Silva DA, Byrnes G, Chalk JB, Fink JN, Kimber TE, Schultz D, Hand PJ, Frayne J, Hankey G, Muir K, Gerraty R, Tress BM, Desmond PM. Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the echoplanar imaging thrombolytic evaluation trial (epithet): A placebo-controlled randomised trial. *Lancet Neurol*. 2008;7:299-309
10. Schellinger PD, Thomalla G, Fiehler J, Kohrmann M, Molina CA, Neumann-Haefelin T, Ribo M, Singer OC, Zaro-Weber O, Sobesky J. Mri-based and ct-based thrombolytic therapy in acute stroke within and beyond established time windows: An analysis of 1210 patients. *Stroke*. 2007;38:2640-2645
11. Garcia-Bermejo P, Calleja AI, Perez-Fernandez S, Cortijo E, del Monte JM, Garcia-Porrero M, Fe Munoz M, Fernandez-Herranz R, Arenillas JF. Perfusion computed tomography-guided

- intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke beyond 4.5 hours: A case-control study. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34:31-37
12. Schellinger PD, Fiebach JB, Jansen O, Ringelb PA, Mohr A, Steiner T, Heiland S, Schwab S, Pohlers O, Ryssele H, Orakcioglu B, Sartor K, Hacke W. Stroke magnetic resonance imaging within 6 hours after onset of hyperacute cerebral ischemia. *Ann Neurol.* 2001;49:460-469
 13. Schaefer PW, Barak ER, Kamalian S, Gharai LR, Schwamm L, Gonzalez RG, Lev MH. Quantitative assessment of core/penumbra mismatch in acute stroke: Ct and mr perfusion imaging are strongly correlated when sufficient brain volume is imaged. *Stroke.* 2008;39:2986-2992
 14. Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M, Fischer M, Furlan A, Kaste M, Lees KR, Soehngen M, Warach S. The desmoteplase in acute ischemic stroke trial (dias): A phase ii mri-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke.* 2005;36:66-73
 15. Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, Sachara C, Soehngen M, Warach S, Hacke W. Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (dedas): Evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke.* 2006;37:1227-1231
 16. Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Davalos A, Fiebach JB, Gruber F, Kaste M, Lipka LJ, Pedraza S, Ringelb PA, Rowley HA, Schneider D, Schwamm LH, Leal JS, Soehngen M, Teal PA, Wilhelm-Ogunbiyi K, Wintermark M, Warach S. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by mri perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion ct (dias-2): A prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 2009;8:141-150
 17. Parsons M, Spratt N, Bivard A, Campbell B, Chung K, Miteff F, O'Brien B, Bladin C, McElduff P, Allen C, Bateman G, Donnan G, Davis S, Levi C. A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2012;366:1099-1107
 18. Barreto AD, Alexandrov AV, Lyden P, Lee J, Martin-Schild S, Shen L, Wu TC, Sisson A, Pandurengan R, Chen Z, Rahbar MH, Balucani C, Barlinn K, Sugg RM, Garami Z, Tsvigoulis G, Gonzales NR, Savitz SI, Mikulik R, Demchuk AM, Grotta JC. The argatroban and tissue-type plasminogen activator stroke study: Final results of a pilot safety study. *Stroke.* 2012;43:770-775
 19. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: Results of a randomized phase 2 trial. *Stroke.* 2005;36:880-890
 20. Zinkstok SM, Roos YB. Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: A randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;380:731-737
 21. del Zoppo GJ, Higashida RT, Furlan AJ, Pessin MS, Rowley HA, Gent M. Proact: A phase ii randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. Proact investigators. Prolyse in acute cerebral thromboembolism. *Stroke.* 1998;29:4-11
 22. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The proact ii study: A randomized controlled trial. Prolyse in acute cerebral thromboembolism. *JAMA.* 1999;282:2003-2011
 23. Ogawa A, Mori E, Minematsu K, Taki W, Takahashi A, Nemoto S, Miyamoto S, Sasaki M, Inoue T. Randomized trial of intraarterial infusion of urokinase within 6 hours of middle cerebral

- artery stroke: The middle cerebral artery embolism local fibrinolytic intervention trial (melt) japan. *Stroke*. 2007;38:2633-2639
24. Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, Lutsep HL, Nesbit GM, Grobelny T, Rymer MM, Silverman IE, Higashida RT, Budzik RF, Marks MP. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: Results of the merci trial. *Stroke*. 2005;36:1432-1438
 25. Smith WS, Sung G, Saver J, Budzik R, Duckwiler G, Liebeskind DS, Lutsep HL, Rymer MM, Higashida RT, Starkman S, Gobin YP, Frei D, Grobelny T, Hellinger F, Huddle D, Kidwell C, Koroshetz W, Marks M, Nesbit G, Silverman IE. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: Final results of the multi merci trial. *Stroke*. 2008;39:1205-1212
 26. Bose A, Henkes H, Alfke K, Reith W, Mayer TE, Berlis A, Branca V, Sit SP. The penumbra system: A mechanical device for the treatment of acute stroke due to thromboembolism. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29:1409-1413
 27. Castano C, Dorado L, Guerrero C, Millan M, Gomis M, Perez de la Ossa N, Castellanos M, Garcia MR, Domenech S, Davalos A. Mechanical thrombectomy with the solitaire ab device in large artery occlusions of the anterior circulation: A pilot study. *Stroke*. 2010;41:1836-1840
 28. Roth C, Papanagiotou P, Behnke S, Walter S, Haass A, Becker C, Fassbender K, Politi M, Korner H, Romann MS, Reith W. Stent-assisted mechanical recanalization for treatment of acute intracerebral artery occlusions. *Stroke*. 2010;41:2559-2567
 29. Mpotsaris A, Bussmeyer M, Loehr C, Oelerich M, Buchner H, Weber W. Mechanical thrombectomy in severe acute stroke: Preliminary results of the solitaire stent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:117-118
 30. San Roman L, Obach V, Blasco J, Macho J, Lopez A, Urrea X, Tomasello A, Cervera A, Amaro S, Perandreu J, Branera J, Capurro S, Oleaga L, Chamorro A. Single-center experience of cerebral artery thrombectomy using the trevo device in 60 patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 2012;43:1657-1659
 31. Saver JL, Jahan R, Levy EI, Jovin TG, Baxter B, Nogueira RG, Clark W, Budzik R, Zaidat OO. Solitaire flow restoration device versus the merci retriever in patients with acute ischaemic stroke (swift): A randomised, parallel-group, non-inferiority trial. *Lancet*. 2012;380:1241-1249
 32. Nogueira RG, Lutsep HL, Gupta R, Jovin TG, Albers GW, Walker GA, Liebeskind DS, Smith WS. Trevo versus merci retrievers for thrombectomy revascularisation of large vessel occlusions in acute ischaemic stroke (trevo 2): A randomised trial. *Lancet*. 2012;380:1231-1240
 33. Lewandowski CA, Frankel M, Tomsick TA, Broderick J, Frey J, Clark W, Starkman S, Grotta J, Spilker J, Khoury J, Brott T. Combined intravenous and intra-arterial r-tpa versus intra-arterial therapy of acute ischemic stroke: Emergency management of stroke (ems) bridging trial. *Stroke*. 1999;30:2598-2605
 34. Combined intravenous and intra-arterial recanalization for acute ischemic stroke: The interventional management of stroke study. *Stroke*. 2004;35:904-911
 35. Khatri P, Hill MD, Palesch YY, Spilker J, Jauch EC, Carrozzella JA, Demchuk AM, Martin R, Mauldin P, Dillon C, Ryckborst KJ, Janis S, Tomsick TA, Broderick JP. Methodology of the interventional management of stroke iii trial. *Int J Stroke*. 2008;3:130-137

36. Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Huertas R, Romero F, Alvarez-Sabin J. Time course of tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute cardioembolic stroke: A case-control study. *Stroke*. 2001;32:2821-2827
37. Zangerle A, Kiechl S, Spiegel M, Furtner M, Knoflach M, Werner P, Mair A, Wille G, Schmidauer C, Gautsch K, Gotwald T, Felber S, Poewe W, Willeit J. Recanalization after thrombolysis in stroke patients: Predictors and prognostic implications. *Neurology*. 2007;68:39-44
38. Rha JH, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: A meta-analysis. *Stroke*. 2007;38:967-973
39. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moye LA, Hill MD, Wojner AW. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2004;351:2170-2178
40. Saqqur M, Uchino K, Demchuk AM, Molina CA, Garami Z, Calleja S, Akhtar N, Orouk FO, Salam A, Shuaib A, Alexandrov AV. Site of arterial occlusion identified by transcranial doppler predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke. *Stroke*. 2007;38:948-954
41. Alvarez-Sabin J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribo M, Santamarina E, Quintana M, Monasterio J, Montaner J. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: Relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke*. 2004;35:1316-1322
42. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Alvarez-Sabin J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 2004;91:1146-1151
43. Christou I, Felberg RA, Demchuk AM, Burgin WS, Malkoff M, Grotta JC, Alexandrov AV. Intravenous tissue plasminogen activator and flow improvement in acute ischemic stroke patients with internal carotid artery occlusion. *J Neuroimaging*. 2002;12:119-123
44. Puetz V, Dzialowski I, Hill MD, Subramaniam S, Sylaja PN, Krol A, O'Reilly C, Hudon ME, Hu WY, Coutts SB, Barber PA, Watson T, Roy J, Demchuk AM. Intracranial thrombus extent predicts clinical outcome, final infarct size and hemorrhagic transformation in ischemic stroke: The clot burden score. *Int J Stroke*. 2008;3:230-236
45. Wu JH, Siddiqui K, Diamond SL. Transport phenomena and clot dissolving therapy: An experimental investigation of diffusion-controlled and permeation-enhanced fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 1994;72:105-112
46. Puig J, Pedraza S, Demchuk A, Daunis IEJ, Termes H, Blasco G, Soria G, Boada I, Remollo S, Banos J, Serena J, Castellanos M. Quantification of thrombus hounsfield units on noncontrast ct predicts stroke subtype and early recanalization after intravenous recombinant tissue plasminogen activator. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:90-96
47. Saqqur M, Tsvigoulis G, Molina CA, Demchuk AM, Shuaib A, Alexandrov AV. Residual flow at the site of intracranial occlusion on transcranial doppler predicts response to intravenous thrombolysis: A multi-center study. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27:5-12
48. Blinc A, Francis CW. Transport processes in fibrinolysis and fibrinolytic therapy. *Thromb Haemost*. 1996;76:481-491

49. Bang OY, Saver JL, Kim SJ, Kim GM, Chung CS, Ovbiagele B, Lee KH, Liebeskind DS. Collateral flow predicts response to endovascular therapy for acute ischemic stroke. *Stroke*. 2011;42:693-699
50. Calleja AI, Cortijo E, Garcia-Bermejo P, Gomez RD, Perez-Fernandez S, Del Monte JM, Munoz MF, Fernandez-Herranz R, Arenillas JF. Collateral circulation on perfusion-computed tomography-source images predicts the response to stroke intravenous thrombolysis. *Eur J Neurol*. 2012
51. Ribo M, Molina C, Montaner J, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Acute hyperglycemia state is associated with lower tpa-induced recanalization rates in stroke patients. *Stroke*. 2005;36:1705-1709
52. Kimura K, Iguchi Y, Yamashita S, Shibasaki K, Kobayashi K, Inoue T. Atrial fibrillation as an independent predictor for no early recanalization after iv-t-tpa in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2008;267:57-61
53. Eames PJ, Mistri AK, Shah N, Robinson TG. Acute stroke hypertension: Current and future management. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2005;3:405-412
54. Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Ribo M, Rubiera M, Alvarez-Sabin J. Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes. *Stroke*. 2004;35:486-490
55. Savitz SI, Schlaug G, Caplan L, Selim M. Arterial occlusive lesions recanalize more frequently in women than in men after intravenous tissue plasminogen activator administration for acute stroke. *Stroke*. 2005;36:1447-1451
56. Dhall DP, Nair CH. Effects of gliclazide on fibrin network. *J Diabetes Complications*. 1994;8:231-234
57. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor v, and factor xiii and by enhancing factor va inactivation. *Circulation*. 2001;103:2248-2253
58. Williams S, Fatah K, Hjemdahl P, Blomback M. Better increase in fibrin gel porosity by low dose than intermediate dose acetylsalicylic acid. *Eur Heart J*. 1998;19:1666-1672
59. He S, Blomback M, Yoo G, Sinha R, Henschen-Edman AH. Modified clotting properties of fibrinogen in the presence of acetylsalicylic acid in a purified system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:531-535
60. Nielsen VG, Kirklin JK, Holman WL, Steenwyk BL. Clot lifespan model analysis of the effects of warfarin on thrombus growth and fibrinolysis: Role of contact protein and tissue factor initiation. *ASAIO J*. 2009;55:33-40
61. 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
62. Demchuk AM, Tanne D, Hill MD, Kasner SE, Hanson S, Grond M, Levine SR. Predictors of good outcome after intravenous tpa for acute ischemic stroke. *Neurology*. 2001;57:474-480

63. Molina CA, Alexandrov AV, Demchuk AM, Saqqur M, Uchino K, Alvarez-Sabin J. Improving the predictive accuracy of recanalization on stroke outcome in patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2004;35:151-156
64. Tan IY, Demchuk AM, Hopyan J, Zhang L, Gladstone D, Wong K, Martin M, Symons SP, Fox AJ, Aviv RI. Ct angiography clot burden score and collateral score: Correlation with clinical and radiologic outcomes in acute middle cerebral artery infarct. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30:525-531
65. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-1607
66. Arenillas JF, Moro MA, Davalos A. The metabolic syndrome and stroke: Potential treatment approaches. *Stroke*. 2007;38:2196-2203
67. Hunt KJ, Resendez RG, Williams K, Haffner SM, Stern MP. National cholesterol education program versus world health organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the san antonio heart study. *Circulation*. 2004;110:1251-1257
68. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel iii). *JAMA*. 2001;285:2486-2497
69. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal: Joint statement from the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28:2289-2304
70. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet Med*. 2006;23:469-480
71. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An american heart association/national heart, lung, and blood institute scientific statement. *Circulation*. 2005;112:2735-2752
72. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; american heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*. 2009;120:1640-1645
73. D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Bai M, Hanley DA, Bastepe M, Salisbury SR, Brown EM, Cole DE, Hendy GN. Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1309-1318
74. Reaven GM. The metabolic syndrome: Is this diagnosis necessary? *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1237-1247
75. Reaven G. Metabolic syndrome: Pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:286-288
76. Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the framingham offspring study. *Diabetes*. 2005;54:3252-3257

77. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: Prevalence and associated risk factor findings in the us population from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* 2003;163:427-436
78. Haffner S, Taegtmeier H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation.* 2003;108:1541-1545
79. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, Morris R, Zavaroni I, van Dam R, Feskens E, Gabriel R, Diet M, Nilsson P, Hedblad B. Frequency of the who metabolic syndrome in european cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002;28:364-376
80. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among us adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey. *JAMA.* 2002;287:356-359
81. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* 2002;288:2709-2716
82. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001;24:683-689
83. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.S. Adults. *Diabetes Care.* 2004;27:2444-2449
84. Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64 years. The who monica project. *World Health Stat Q.* 1988;41:115-140
85. Rodriguez Artalejo F, Lopez Garcia E, Gutierrez-Fisac JL, Banegas Banegas JR, Lafuente Urdinguio PJ, Dominguez Rojas V. Changes in the prevalence of overweight and obesity and their risk factors in spain, 1987-1997. *Prev Med.* 2002;34:72-81
86. Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, Tur Mari J, Mataix Verdu J, Llopis Gonzalez J, Tojo R, Foz Sala M. [prevalence of obesity in spain: Results of the seedo 2000 study]. *Med Clin (Barc).* 2003;120:608-612
87. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 2000;43:821-835
88. Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR. Angiotensin ii and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302:128-139
89. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell.* 2001;104:517-529
90. Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol.* 2001;27:85-91
91. Maddux BA, See W, Lawrence JC, Jr., Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat l6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes.* 2001;50:404-410

92. Neel JV. Diabetes mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? 1962. *Bull World Health Organ.* 1999;77:694-703; discussion 692-693
93. Phillips DI. Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. *Diabetologia.* 1996;39:1119-1122
94. Sanchez-Margalet V. Modulation of insulin receptor signalling by pancreastatin in htc hepatoma cells. *Diabetologia.* 1999;42:317-325
95. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem.* 2002;277:1531-1537
96. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-2415
97. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated c-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999;282:2131-2135
98. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of ikkbeta. *Science.* 2001;293:1673-1677
99. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for jnk in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420:333-336
100. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276:16683-16689
101. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The rage axis and endothelial dysfunction: Maladaptive roles in the diabetic vasculature and beyond. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:237-243
102. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-1761
103. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of ikk-beta and nf-kappab. *Nat Med.* 2005;11:183-190
104. Fernandez-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19:10-16
105. Fernandez-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55:273-278
106. Ricart W, Fernandez-Real JM. [insulin resistance as a mechanism of adaptation during human evolution]. *Endocrinol Nutr.* 2010;57:381-390
107. Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Abdo T, Tripathy D, Chaudhuri A, Dandona P. Increase in intranuclear nuclear factor kappa b and decrease in inhibitor kappa b in mononuclear cells after a mixed meal: Evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:682-690
108. Williams ES, Baylin A, Campos H. Adipose tissue arachidonic acid and the metabolic syndrome in costa rican adults. *Clin Nutr.* 2007;26:474-482

109. Salgin B, Ong KK, Thankamony A, Emmett P, Wareham NJ, Dunger DB. Higher fasting plasma free fatty acid levels are associated with lower insulin secretion in children and adults and a higher incidence of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:3302-3309
110. Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Curr Biol.* 2002;12:R236-238
111. Gerich JE. Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1993;7:551-586
112. Bays HE. "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med.* 2009;122:S26-37
113. Tabak AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimaki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: An analysis from the whitehall ii study. *Lancet.* 2009;373:2215-2221
114. Rocchini AP. Obesity hypertension, salt sensitivity and insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2000;10:287-294
115. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2010;375:181-183
116. Yanai H, Tomono Y, Ito K, Furutani N, Yoshida H, Tada N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutr J.* 2008;7:10
117. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259:87-91
118. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:939-949
119. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. Tlr4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:3015-3025
120. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-432
121. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to c1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995;270:26746-26749
122. Hoffman M. Connecting peptide, correcting peptide? *Ann Intern Med.* 1997;127:1147-1148
123. Nordquist L, Wahren J. C-peptide: The missing link in diabetic nephropathy? *Rev Diabet Stud.* 2009;6:203-210
124. Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell Metab.* 2008;7:400-409
125. Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 (glp-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005;21:91-117
126. Efendic S, Portwood N. Overview of incretin hormones. *Horm Metab Res.* 2004;36:742-746
127. Thorens B. Glucagon-like peptide-1 and control of insulin secretion. *Diabete Metab.* 1995;21:311-318
128. Skrha J, Hilgertova J, Jarolimkova M, Kunesova M, Hill M. Meal test for glucose-dependent insulinotropic peptide (gip) in obese and type 2 diabetic patients. *Physiol Res.* 2010;59:749-755

129. Deacon CF, Carr RD, Holst JJ. Dpp-4 inhibitor therapy: New directions in the treatment of type 2 diabetes. *Front Biosci.* 2008;13:1780-1794
130. Toft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3853-3860
131. Meier JJ, Weyhe D, Michaely M, Senkal M, Zumtobel V, Nauck MA, Holst JJ, Schmidt WE, Gallwitz B. Intravenous glucagon-like peptide 1 normalizes blood glucose after major surgery in patients with type 2 diabetes. *Crit Care Med.* 2004;32:848-851
132. Gonzalez-Barranco J. [leptin and obesity: Is the use of this hormone the solution to this illness?]. *Rev Invest Clin.* 2000;52:113-114
133. Simon E, Del Barrio AS. [leptin and obesity]. *An Sist Sanit Navar.* 2002;25 Suppl 1:53-64
134. Leung YM, Kwan CY. Dual vascular effects of leptin via endothelium: Hypothesis and perspective. *Chin J Physiol.* 2008;51:1-6
135. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001;409:307-312
136. Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, Zhu Q, Considine RV. Serum resistin (fizz3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5452-5455
137. Gabrieli I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: An adipokine-mediated process? *Diabetes.* 2002;51:2951-2958
138. Levy JR, Davenport B, Clore JN, Stevens W. Lipid metabolism and resistin gene expression in insulin-resistant fischer 344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E626-633
139. McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet.* 2002;359:46-47
140. Adeghate E. An update on the biology and physiology of resistin. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2485-2496
141. Stumvoll M, Haring H. Resistin and adiponectin--of mice and men. *Obes Res.* 2002;10:1197-1199
142. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, Simon I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: Relationships in obesity. *Obes Res.* 2004;12:962-971
143. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-1119
144. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: Effect of weight loss. *Obes Res.* 2002;10:1095-1103
145. Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines tnf-alpha and il-12 in macrophages by nf-kappab-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1092-1101

146. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: Further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003;108:736-740
147. Asensio C, Cettour-Rose P, Theander-Carrillo C, Rohner-Jeanrenaud F, Muzzin P. Changes in glycemia by leptin administration or high-fat feeding in rodent models of obesity/type 2 diabetes suggest a link between resistin expression and control of glucose homeostasis. *Endocrinology*. 2004;145:2206-2213
148. Lee JH, Bullen JW, Jr., Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: Lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288:E625-632
149. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*. 2004;53:1671-1679
150. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: Correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2003;149:331-335
151. Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, Argyropoulos G. A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes*. 2003;52:1611-1618
152. Fujinami A, Obayashi H, Ohta K, Ichimura T, Nishimura M, Matsui H, Kawahara Y, Yamazaki M, Ogata M, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Nakano K, Ohta M. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: Resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*. 2004;339:57-63
153. McTernan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, McTernan CL, Clark PM, Smith SA, Barnett AH, Kumar S. Resistin and type 2 diabetes: Regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:6098-6106
154. Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd Hiler M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:674-678
155. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: Cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4848-4856
156. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285:561-564
157. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, Smith SR. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1844-1848
158. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001;50:2199-2202

159. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Jr., Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem*. 2001;276:25651-25653
160. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: A protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005;307:426-430
161. Campos DB, Palin MF, Bordignon V, Murphy BD. The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:223-231
162. Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-b cell colony-enhancing factor (pbf)/visfatin: A novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2008;83:804-816
163. Kloting N, Kloting I. Visfatin: Gene expression in isolated adipocytes and sequence analysis in obese wokr rats compared with lean control rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:1070-1072
164. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Kawagoe R, Yamamoto Y, Kawada Y, Asayama K, Shirahata A. Plasma visfatin concentration as a surrogate marker for visceral fat accumulation in obese children. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16:384-388
165. Filippatos TD, Derdemezis CS, Kiortsis DN, Tselepis AD, Elisaf MS. Increased plasma levels of visfatin/pre-b cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2007;30:323-326
166. Haider DG, Holzer G, Schaller G, Weghuber D, Widhalm K, Wagner O, Kapiotis S, Wolz M. The adipokine visfatin is markedly elevated in obese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;43:548-549
167. Berndt J, Kloting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mrna expression in humans. *Diabetes*. 2005;54:2911-2916
168. Hammarstedt A, Pihlajamaki J, Rotter Sopasakis V, Gogg S, Jansson PA, Laakso M, Smith U. Visfatin is an adipokine, but it is not regulated by thiazolidinediones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1181-1184
169. Sun G, Bishop J, Khalili S, Vasdev S, Gill V, Pace D, Fitzpatrick D, Randell E, Xie YG, Zhang H. Serum visfatin concentrations are positively correlated with serum triacylglycerols and down-regulated by overfeeding in healthy young men. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:399-404
170. Pagano C, Pilon C, Olivieri M, Mason P, Fabris R, Serra R, Milan G, Rossato M, Federspil G, Vettor R. Reduced plasma visfatin/pre-b cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3165-3170
171. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol*. 2007;178:1748-1758
172. Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue tnfalpa, leptin and il-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28:993-997

173. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. Niddm as a disease of the innate immune system: Association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome x. *Diabetologia*. 1997;40:1286-1292
174. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1154-1159
175. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793-1801
176. Wang B, Trayhurn P. Acute and prolonged effects of tnf-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch*. 2006;452:418-427
177. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. Irs-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in tnf-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271:665-668
178. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking tnf-alpha function. *Nature*. 1997;389:610-614
179. Consensus development conference on insulin resistance. 5-6 november 1997. American diabetes association. *Diabetes Care*. 1998;21:310-314
180. Del Prato S. Measurement of insulin resistance in vivo. *Drugs*. 1999;58 Suppl 1:3-6; discussion 75-82
181. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237:E214-223
182. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22:1462-1470
183. Turner RC, Mathews DR, Holman RR, Peto J. Relative contributions of insulin deficiency and insulin resistance in maturity-onset diabetes. *Lancet*. 1982;1:596-598
184. Hanson RL, Pratley RE, Bogardus C, Narayan KM, Roumain JM, Imperatore G, Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*. 2000;151:190-198
185. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000;23:57-63
186. Emoto M, Nishizawa Y, Maekawa K, Hiura Y, Kanda H, Kawagishi T, Shoji T, Okuno Y, Morii H. Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Diabetes Care*. 1999;22:818-822
187. Gorter PM, Olijhoek JK, van der Graaf Y, Algra A, Rabelink TJ, Visseren FL. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2004;173:363-369

188. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the third national health and nutrition examination survey. *Circulation*. 2004;109:42-46
189. Milionis HJ, Rizos E, Goudevenos J, Seferiadis K, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Components of the metabolic syndrome and risk for first-ever acute ischemic nonembolic stroke in elderly subjects. *Stroke*. 2005;36:1372-1376
190. Suk SH, Sacco RL, Boden-Albala B, Cheun JF, Pittman JG, Elkind MS, Paik MC. Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: The northern manhattan stroke study. *Stroke*. 2003;34:1586-1592
191. Dekker JM, Girman C, Rhodes T, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, Heine RJ. Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the hoorn study. *Circulation*. 2005;112:666-673
192. Koren-Morag N, Goldbourt U, Tanne D. Relation between the metabolic syndrome and ischemic stroke or transient ischemic attack: A prospective cohort study in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Stroke*. 2005;36:1366-1371
193. Najarian RM, Sullivan LM, Kannel WB, Wilson PW, D'Agostino RB, Wolf PA. Metabolic syndrome compared with type 2 diabetes mellitus as a risk factor for stroke: The framingham offspring study. *Arch Intern Med*. 2006;166:106-111
194. Chen HJ, Bai CH, Yeh WT, Chiu HC, Pan WH. Influence of metabolic syndrome and general obesity on the risk of ischemic stroke. *Stroke*. 2006;37:1060-1064
195. Kurl S, Laukkanen JA, Niskanen L, Laaksonen D, Sivenius J, Nyyssonen K, Salonen JT. Metabolic syndrome and the risk of stroke in middle-aged men. *Stroke*. 2006;37:806-811
196. Olijhoek JK, van der Graaf Y, Banga JD, Algra A, Rabelink TJ, Visseren FL. The metabolic syndrome is associated with advanced vascular damage in patients with coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J*. 2004;25:342-348
197. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Lehn-Stefan A, Overkamp D, Dietz K, Haring HU. Insulin resistant young subjects at risk of accelerated atherosclerosis exhibit a marked reduction in peripheral endothelial function early in life but not differences in intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2003;171:303-309
198. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome x): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993;36:62-67
199. Reaven GM. Multiple chd risk factors in type 2 diabetes: Beyond hyperglycaemia. *Diabetes Obes Metab*. 2002;4 Suppl 1:S13-18
200. Hayden MR, Tyagi SC. Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of nos, no, and redox stress. *Cardiovasc Diabetol*. 2003;2:2
201. Shoemaker JK, Bonen A. Vascular actions of insulin in health and disease. *Can J Appl Physiol*. 1995;20:127-154

202. Kooistra T, Bosma PJ, Tons HA, van den Berg AP, Meyer P, Princen HM. Plasminogen activator inhibitor 1: Biosynthesis and mrna level are increased by insulin in cultured human hepatocytes. *Thromb Haemost.* 1989;62:723-728
203. Bergholm R, Westerbacka J, Vehkavaara S, Seppala-Lindroos A, Goto T, Yki-Jarvinen H. Insulin sensitivity regulates autonomic control of heart rate variation independent of body weight in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1403-1409
204. Golden SH, Folsom AR, Coresh J, Sharrett AR, Szklo M, Brancati F. Risk factor groupings related to insulin resistance and their synergistic effects on subclinical atherosclerosis: The atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes.* 2002;51:3069-3076
205. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna RC, Muggeo M. Carotid atherosclerosis and coronary heart disease in the metabolic syndrome: Prospective data from the bruneck study. *Diabetes Care.* 2003;26:1251-1257
206. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Unuma T, Tooda E, Nagai R, Togo M, Tsukamoto K, Hashimoto H, Yamakado M. Association between insulin resistance and carotid arteriosclerosis in subjects with normal fasting glucose and normal glucose tolerance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:295-301
207. Langenfeld MR, Forst T, Hohberg C, Kann P, Lubben G, Konrad T, Fullert SD, Sachara C, Pfoetzner A. Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: Results from a controlled randomized study. *Circulation.* 2005;111:2525-2531
208. Bang OY, Kim JW, Lee JH, Lee MA, Lee PH, Joo IS, Huh K. Association of the metabolic syndrome with intracranial atherosclerotic stroke. *Neurology.* 2005;65:296-298
209. Ovbiagele B, Saver JL, Lynn MJ, Chimowitz M. Impact of metabolic syndrome on prognosis of symptomatic intracranial atherostenosis. *Neurology.* 2006;66:1344-1349
210. D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi DM, D'Armiento MR, Crimi G, Abete P, Palinski W, Condorelli M, Napoli C. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke.* 2001;32:2472-2479
211. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J. Basic mechanisms in intracranial large-artery atherosclerosis: Advances and challenges. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20 Suppl 2:75-83
212. Arenillas JF, Molina CA, Chacon P, Rovira A, Montaner J, Coscojuela P, Sanchez E, Quintana M, Alvarez-Sabin J. High lipoprotein (a), diabetes, and the extent of symptomatic intracranial atherosclerosis. *Neurology.* 2004;63:27-32
213. Lopez-Cancio E, Galan A, Dorado L, Jimenez M, Hernandez M, Millan M, Reverte S, Sunol A, Barallat J, Massuet A, Alzamora MT, Davalos A, Arenillas JF. Biological signatures of asymptomatic extra- and intracranial atherosclerosis: The barcelona-asia (asymptomatic intracranial atherosclerosis) study. *Stroke.* 2012;43:2712-2719
214. Bang OY, Saver JL, Ovbiagele B, Choi YJ, Yoon SR, Lee KH. Adiponectin levels in patients with intracranial atherosclerosis. *Neurology.* 2007;68:1931-1937
215. Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2008;99:995-1000

216. Palomo I, Alarcon M, Moore-Carrasco R, Argiles JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review). *Int J Mol Med*. 2006;18:969-974
217. Palomo I, Moore-Carrasco R, Alarcon M, Rojas A, Espana F, Andres V, Gonzalez-Navarro H. Pathophysiology of the proatherothrombotic state in the metabolic syndrome. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2:194-208
218. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: The euroclot study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2783-2789
219. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, Weisel JW. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1354-1361
220. Stegenga ME, van der Crabben SN, Levi M, de Vos AF, Tanck MW, Sauerwein HP, van der Poll T. Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans. *Diabetes*. 2006;55:1807-1812
221. Arenillas JF, Ispuerto L, Millan M, Escudero D, Perez de la Ossa N, Dorado L, Guerrero C, Serena J, Castillo J, Davalos A. Metabolic syndrome and resistance to iv thrombolysis in middle cerebral artery ischemic stroke. *Neurology*. 2008;71:190-195
222. Arenillas JF, Sandoval P, Perez de la Ossa N, Millan M, Guerrero C, Escudero D, Dorado L, Lopez-Cancio E, Castillo J, Davalos A. The metabolic syndrome is associated with a higher resistance to intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in women than in men. *Stroke*. 2009;40:344-349
223. Boden-Albala B, Sacco RL, Lee HS, Grahame-Clarke C, Rundek T, Elkind MV, Wright C, Giardina EG, DiTullio MR, Homma S, Paik MC. Metabolic syndrome and ischemic stroke risk: Northern manhattan study. *Stroke*. 2008;39:30-35
224. Fuentes B, Castillo J, San Jose B, Leira R, Serena J, Vivancos J, Davalos A, Nunez AG, Egido J, Diez-Tejedor E. The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: The glycemia in acute stroke (glias) study. *Stroke*. 2009;40:562-568
225. Moghissi ES, Korytkowski MT, DiNardo M, Einhorn D, Hellman R, Hirsch IB, Inzucchi SE, Ismail-Beigi F, Kirkman MS, Umpierrez GE. American association of clinical endocrinologists and american diabetes association consensus statement on inpatient glycemic control. *Diabetes Care*. 2009;32:1119-1131
226. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd. 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
227. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, et al. Measurements of acute cerebral infarction: A clinical examination scale. *Stroke*. 1989;20:864-870
228. 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
229. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The european cooperative acute stroke study (ecass). *JAMA*. 1995;274:1017-1025

230. Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD, Alexandrov AV. Thrombolysis in brain ischemia (tibi) transcranial doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2001;32:89-93
231. Burgin WS, Malkoff M, Felberg RA, Demchuk AM, Christou I, Grotta JC, Alexandrov AV. Transcranial doppler ultrasound criteria for recanalization after thrombolysis for middle cerebral artery stroke. *Stroke*. 2000;31:1128-1132
232. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419
233. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the san antonio heart study. *Diabetes Care*. 1997;20:1087-1092
234. Alvarez-Sabin J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M. Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator--treated patients. *Stroke*. 2003;34:1235-1241
235. Natarajan S, Siddiqui A, Chaudhuri A, Dandona P. Comment on: Calleja et al. Insulin resistance is associated with a poor response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. *Diabetes care* 2011;34:2413-2417. *Diabetes Care*. 2012;35:e49; author reply e50
236. Rundek T, Gardener H, Xu Q, Goldberg RB, Wright CB, Boden-Albala B, Disla N, Paik MC, Elkind MS, Sacco RL. Insulin resistance and risk of ischemic stroke among nondiabetic individuals from the northern manhattan study. *Arch Neurol*. 2010;67:1195-1200
237. Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, Schmidt WE, Gallwitz B. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*. 2004;53:654-662
238. Irwin N, Gault VA, Green BD, Greer B, McCluskey JT, Harriott P, O'Harte FP, Flatt PR. Effects of short-term chemical ablation of the gip receptor on insulin secretion, islet morphology and glucose homeostasis in mice. *Biol Chem*. 2004;385:845-852
239. Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;297:127-136
240. Llompart-Pou JA, Fernandez-de-Castillo AG, Burguera B, Perez-Barcena J, Marse P, Rodriguez-Yago M, Barcelo A, Raurich JM. Stress hyperglycaemia in critically ill patients: Potential role of incretin hormones; a preliminary study. *Nutr Hosp*. 2012;27:130-137
241. Allport L, Baird T, Butcher K, Macgregor L, Prosser J, Colman P, Davis S. Frequency and temporal profile of poststroke hyperglycemia using continuous glucose monitoring. *Diabetes Care*. 2006;29:1839-1844
242. Singh P, Peterson TE, Barber KR, Kuniyoshi FS, Jensen A, Hoffmann M, Shamsuzzaman AS, Somers VK. Leptin upregulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392:47-52
243. Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT. Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:e119-122

244. Konstantinides S, Schafer K, Neels JG, Dellas C, Loskutoff DJ. Inhibition of endogenous leptin protects mice from arterial and venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2196-2201
245. Zhang JY, Jr., Si YL, Liao J, Yan GT, Deng ZH, Xue H, Wang LH, Zhang K. Leptin administration alleviates ischemic brain injury in mice by reducing oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72:982-991
246. Cheyuo C, Wu R, Zhou M, Jacob A, Coppa G, Wang P. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. *Shock.* 2011;35:258-265
247. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation.* 2001;104:1430-1435
248. Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2004;110:3674-3679
249. Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K. Role of adipokines in complications related to obesity: A review. *Adv Med Sci.* 2009;54:150-157
250. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke.* 2000;31:2325-2329
251. Calleja AI, Garcia-Bermejo P, Cortijo E, Bustamante R, Rojo Martinez E, Gonzalez Sarmiento E, Fernandez-Herranz R, Arenillas JF. Insulin resistance is associated with a poor response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. *Diabetes Care.* 2011;34:2413-2417
252. Chen B, Liao WQ, Xu N, Xu H, Wen JY, Yu CA, Liu XY, Li CL, Zhao SM, Campbell W. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action. *Brain Res.* 2009;1273:129-137
253. Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA, Ouchi N. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation.* 2008;117:216-223
254. Efsthathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, Gratsias YE, Pefanis AV, Mountokalakis TD. Plasma adiponectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. *Stroke.* 2005;36:1915-1919



ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I: CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

<p>HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VALLADOLID</p> <p>Unidad de Ictus</p>	<p>REGISTRO DE TROMBÓLISIS Paciente nº</p>								
<p>1. FECHA DEL ICTUS: _____</p>									
<p>2. TERRITORIO AFECTO:</p>									
<p><input type="checkbox"/> A. carótida intracraneal</p> <p><input type="checkbox"/> ACM</p> <p><input type="checkbox"/> ACA</p> <p><input type="checkbox"/> Vertebrobasilar</p> <p><input type="checkbox"/> No determinado</p>	<p><input type="checkbox"/> DERECHA</p> <p><input type="checkbox"/> IZQUIERDA</p>								
<p>3. DOSIS TOTAL RTPA: _____ mg</p>									
<p>4. TIEMPOS DE LATENCIA (hh:mm)</p>									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">INICIO SÍNTOMAS</td><td style="width: 100px;"></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">LLEGADA</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">TC Ó RM BASAL</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">INICIO TRATAMIENTO</td><td></td></tr> </table>	INICIO SÍNTOMAS		LLEGADA		TC Ó RM BASAL		INICIO TRATAMIENTO		
INICIO SÍNTOMAS									
LLEGADA									
TC Ó RM BASAL									
INICIO TRATAMIENTO									
<p>5. TIEMPO DE INICIO DE FIBRINOLISIS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> < 3 HORAS <input type="radio"/> 3 - 4.5 HORAS <input type="radio"/> 4.5 - 6 HORAS O INICIO DESCONOCIDO 									
<p>6. FACTORES DE RIESGO (conocidos o diagnosticados durante ingreso) E HISTORIA VASCULAR:</p>									
<p><input type="checkbox"/> Fumador (activo o exfumador 5 años)</p> <p><input type="checkbox"/> Enolismo > 40 g/d</p> <p><input type="checkbox"/> HTA (TA >140/90 o no hipotensor)</p> <p><input type="checkbox"/> DM (dos det. glic ayunas >126 o no hipoglicemiante)</p> <p><input type="checkbox"/> DL (col total > 200, LDL > 130, HDL < 35, TG >170 o no)</p> <p><input type="checkbox"/> ACxFA (previa o en ECG al ingreso)</p> <p><input type="checkbox"/> Card. Isquémica</p> <p><input type="checkbox"/> Vasc. Periférica</p> <p><input type="checkbox"/> Ictus isquémico previo</p> <p><input type="checkbox"/> EPOC</p> <p><input type="checkbox"/> Antecedentes familiares de ictus</p>	<p>TRATAMIENTO PREVIO:</p> <p><input type="checkbox"/> AAS</p> <p><input type="checkbox"/> CLOPIDOGREL</p> <p><input type="checkbox"/> ESTATINAS</p> <p><input type="checkbox"/> IECAS</p> <p><input type="checkbox"/> ARA 2</p> <p><input type="checkbox"/> ANTIDIABÉTICOS ORALES</p> <p><input type="checkbox"/> INSULINA</p> <p><input type="checkbox"/> Otros: _____</p>								

7. ACTIVIDAD FÍSICA PREVIA

Domiciliaria: _____ _____
Extradomiciliaria (Km/día, otras actividades): _____ _____

8. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS, CONSTANTES Y ANALÍTICAS

PESO: _____ Kg TALLA: _____ m CINTURA ABDOM: _____ cm	ANALÍTICA de INGRESO (previa al alta): HbA1c: _____ % Glicemia ayunas: _____ mg/dl HDL: _____ mg/dl TG: _____ mg/dl Insulina: _____
SINDROME METABÓLICO: _____ (Criterios AHA-ATPIII: \geq 3 criterios)	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Cintura abdom: ♂ > 94cm ♀ > 80cm ○ TG > 150mg/dl ○ HDL: ♂ < 40cm ♀ < 50cm ○ HTA (> 135/85) ○ Glicem ayunas > 100mg/dl 	

	Variable	Basal	2h	6h	24h	Máxima 0-24	Mínima 0-24
	TEMPERATURA	*	*	*	*	*	*
	TAS	*	*	*	*	*	*
	TAD	*	*	*	*	*	*
Analítica de urgencias	GLUCEMIA	*	*	*	*		
	PLAQUETAS	*					
	TP %	*					
	INR	*					
	LEUCOCITOS	*					
	NIHSS	*	*	*	*	*	*

9. COMPLICACIONES

COMPLICACIONES SISTÉMICAS

COMPLICACIÓN	Fecha y hora
1.-	
2.-	
3.-	

COMPLICACIONES NEUROLÓGICAS:

COMPLICACIÓN	Fecha y hora
1.-Deterioro neurológico precoz (> 4 puntos en NIHSS en 1ª 24 horas)	
2.- Crisis comiciales	
3.- Recurrencia del ictus	

COMPLICACIONES RELACIONADAS CON EL MANEJO DE LA GLUCEMIA

COMPLICACIÓN	Fecha y hora
1.-HIPOGLUCEMIA < 50 mg/dl	
2.-HIPOGLUCEMIA SINTOMÁTICA	

10. ECO DOPPLER TRONCOS SUPRAAÓRTICOS URGENTE

PATRÓN	ACI DERECHA	ACI IZQUIERDA
NORMAL		
< 30%		
30-50%		
50-70%		
> 70%		
OCCLUSIÓN		

11. DOPPLER TRANSCRANEAL en ARTERIA CEREBRAL AFECTADA:

	TIBI (Peor TIBI a x mm)	RECANALIZACIÓN (No / Parcial / Completa)	REOCCLUSIÓN (Si / No)
BASAL			
1 H			
2 H			
24 H			

SI RECANALIZACIÓN DURANTE LA MONITORIZACIÓN (2 H)

TIEMPO HASTA RECANALIZACIÓN (minutos desde el inicio del tratamiento): Tiempo de inicio: _____ min Tiempo de final: _____ min	PATRÓN RECANALIZACIÓN: □ SUDEN (minutos, súbito) □ STEPWISE (< 30 minutos) □ SLOW (> 30 minutos) □ NULA: El TIBI a las 2 horas es idéntico al basal
---	--

12. VARIABLES RADIOLÓGICAS:

TC inicio	Signos precoces	NO	ACM hiperd.	<1/3	>1/3			
	Leucoaraiosis	SI	NO	ASPECTS: _____ puntos				
TC 24-36 h	Hipodensidad	NO	<1/3	>1/3	ACA	ACP	VB	Varios
	Volumen hipodensidad (cm ³)	x		x	=	/2=	cc	
	Transformación hemorrágica	NO	IH1	IH2	PH1	PH2	rPH	
	Tr. Hemorrágica sintomática	SI	NO					
TC 30d	Edema cerebral. Grado:	NO	1	2	3	Maligno		
	Volumen final del infarto	x		x	=	/2=	cc	

Edema:

Grado 1 (borramiento de surcos) / Grado 2 (asimetría ventricular) / Grado 3 (desviación línea media) / Maligno (grado 3 + deterioro neurológico)

Si transformación hemorrágica sintomática: Tiempo de transformación hemorrágica (Horas desde inicio síntomas):

TC PERFUSION BASAL: SI NO <input type="checkbox"/> CBV BASAL: _____ <input type="checkbox"/> MTT BASAL: _____ <input type="checkbox"/> MISMATCH MTT-CBV: _____	TC PERFUSION CONTROL (3-5d): SI NO <input type="checkbox"/> CBV: _____ <input type="checkbox"/> MTT: _____ <input type="checkbox"/> CBV control-CBV basal: _____
--	--

RM MULTIMODAL BASAL: SI NO <input type="checkbox"/> DWI BASAL: _____ <input type="checkbox"/> PWI BASAL: _____ <input type="checkbox"/> MISMATCH PWI-DWI: _____	RM MULTIM CONTROL(3-5d): SI NO <input type="checkbox"/> DWI: _____ <input type="checkbox"/> PWI: _____ <input type="checkbox"/> DWI control-DWI basal: _____
---	--

13. CLASIFICACIÓN TOAST

- CARDIOEMBÓLICO
- ATEROTROMBÓTICO
- LACUNAR
- INDETERMINADO
- OTROS

14. EVOLUCIÓN CLÍNICA:

NIHSS A LOS 7 DÍAS O AL ALTA: _____

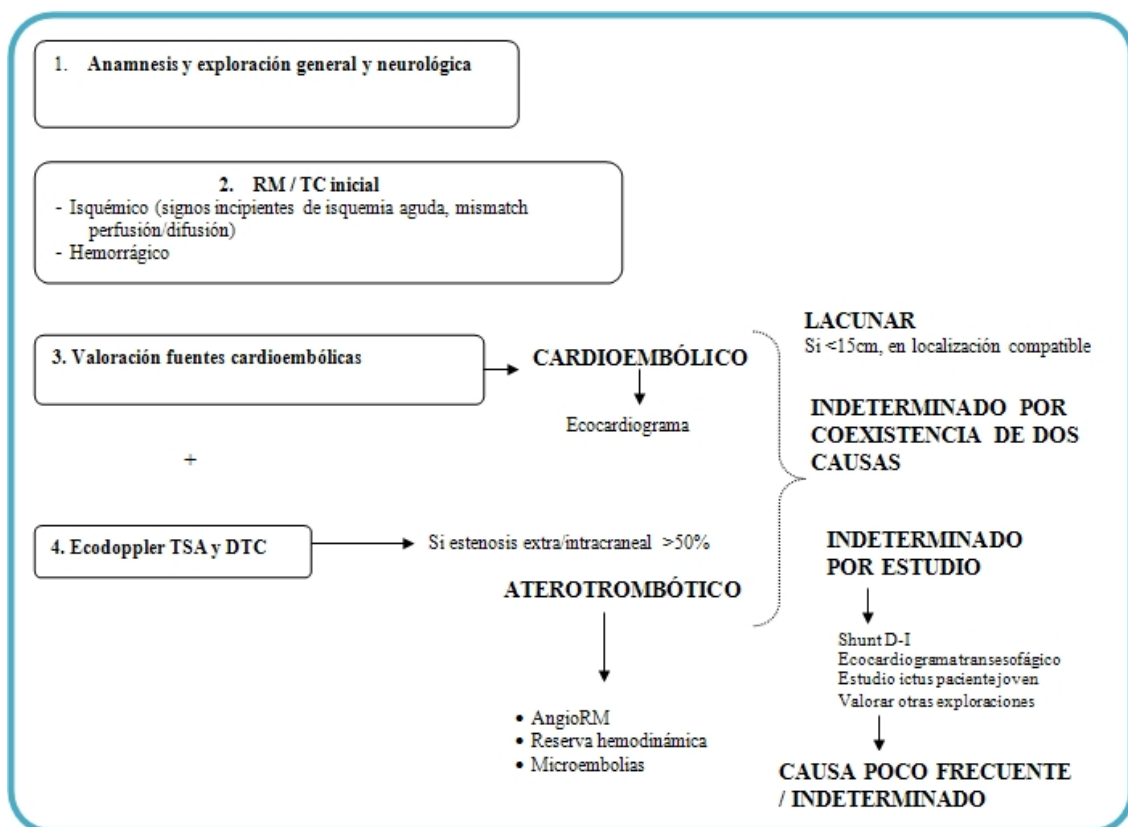
RANKIN A LOS 7 DÍAS O AL ALTA: _____

CITA EN OCCE CON DR/DRA: _____ FECHA _____

RANKIN A LOS 3 MESES _____

Barthel a los 3 meses _____

8.2 ANEXO II: CLASIFICACIÓN TOAST Y ALGORITMO DIAGNÓSTICO



8.3 ANEXO III: ESCALA NIHSS (ESCALA DE ICTUS DEL NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH)

<p>1a. Nivel de conciencia</p>	<p>0 = Alerta, respuestas normales.</p> <p>1 = No alerta pero responde a mínimos estímulos verbales para obedecer o responder.</p> <p>2 = No alerta. Requiere estímulos repetidos o dolorosos para realizar movimientos (no estereotipados o reflejos).</p> <p>3 = Sólo respuestas reflejas o falta total de respuestas.</p>
<p>1b. Nivel de conciencia-Preguntas orales</p> <p>Preguntar:</p> <p>¿<u>En qué mes estamos?</u> y</p> <p>¿<u>Qué edad tiene?</u></p>	<p>0 = Ambas respuestas son correctas.</p> <p>1 = Una respuesta correcta.</p> <p>2 = Ninguna respuesta correcta.</p>
<p>1c. Nivel de conciencia-Órdenes motoras</p> <p>Ordenar :</p> <p>“<u>Cierre los ojos</u>” “<u>Ahora abra los ojos</u>” y con el lado no parético</p> <p>“<u>Cierre la mano haciendo un puño y luego abra la mano.</u>”</p>	<p>0 = Ambas órdenes son correctas.</p> <p>1 = Una orden correcta.</p> <p>2 = Ninguna orden correcta.</p>
<p>2. Mirada conjugada</p>	<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Paresia parcial de la mirada. Ausencia de paresia total o desviación forzada.</p> <p>2 = Paresia total o desviación forzada de la mirada conjugada.</p>
<p>3. Visual</p> <p>Explorar los campos visuales por confrontación,</p>	<p>0 = No alteración visual.</p> <p>1 = Hemianopsia parcial.</p>

cuadrantes superiores e inferiores.

4. Paresia facial.

Ordenar enseñar los dientes, sonreír o hacer mímica para que el paciente lo imite.

Si el paciente está afásico o poco reactivo dar un estímulo doloroso para observar la mueca.

2 = Hemianopsia completa.

3 = Ceguera total.

0 = Movimiento normal y simétrico.

1 = Borramiento del surco nasogeniano o mínima asimetría al sonreír.

2 = Parálisis total o casi total de la zona inferior de la hemicara.

3 = Parálisis completa con ausencia de movimiento en la zona superior e inferior de la hemicara o bilateral.

5. Paresia del brazo

Explorar el lado no parético en primer lugar.

Ordenar levantar y extender el brazo. No valorar la fuerza de la mano.

Si el paciente está en decúbito, la posición del brazo extendido es a 45°.

Si el paciente está sentado, la posición del brazo extendido es de 90°.

En segundo lugar se explora el lado parético.

Lado derecho y lado izquierdo

0 = Mantiene la posición durante 10 segundos.

1 = Claudicación en menos de 10 segundos, aunque la extremidad no llega a contactar con la cama.

2 = Puede levantar la extremidad pero esta contacta con la cama en menos de 10 segundos.

3 = Existe movimiento de la extremidad pero no la levanta contra gravedad o cae inmediatamente.

4 = Ausencia total de movimiento.

9 = Extremidad amputada a nivel proximal o inmovilizada. No sumar en la puntuación global.

6. Paresia de la pierna

Ordenar levantar la pierna extendida y mantenerla a 30°.

Explorar la pierna no parética en primer lugar y posteriormente explorar el lado parético.

Lado derecho y lado izquierdo

0 = Mantiene la posición durante 5 segundos.

1 = Claudicación en menos de 5 segundos, aunque la extremidad no llega a contactar con la cama.

2 = Puede levantar la extremidad pero esta contacta con la cama en menos de 5 segundos.

3 = Existe movimiento de la extremidad pero no la levanta contra gravedad o cae inmediatamente.

4 = Ausencia total de movimiento.

9 = Extremidad amputada a nivel proximal o

<p>7. Dismetría</p> <p>Explorar dedo-nariz y talón-rodilla con los ojos abiertos.</p> <p>En caso de existir un déficit motor que impida valorar la disimetría, puntuar como ausente "0."</p>	<p>inmovilizada. No sumar en la puntuación global.</p> <p>0 = Ausente.</p> <p>1 = Presente en una extremidad.</p> <p>2 = Presente en 2 extremidades.</p>
<p>8. Sensibilidad</p> <p>Con aguja, o ver la retirada ante estímulo doloroso en el paciente obnubilado.</p> <p>Si alteración bilateral o en coma, puntuar "2".</p>	<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Leve o moderada hipoestesia (posible anestesia algésica pero el paciente nota que se le toca).</p> <p>2 = Anestesia severa o total (no nota que se le toca).</p>
<p>9. Lenguaje</p> <p>Si intubación traqueal o mudo, hacer escribir.</p> <p>Si en coma, puntuar "3".</p>	<p>0 = Normal, no afasia.</p> <p>1 = Afasia leve o moderada.</p> <p>2 = Afasia severa (imposible entenderse con el interlocutor).</p> <p>3 = Mudo con comprensión nula.</p>
<p>10. Disartria.</p> <p>A pesar de la afasia, valorar sólo la articulación.</p> <p>Si afasia=3 (mudo), valorar como Disartria=0</p>	<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Leve o moderada, puede ser entendido aunque con dificultad.</p> <p>2 = Severa, ininteligible o mudo/anártrico (con independencia de la presencia de afasia).</p> <p>9 = Intubado u otras barreras físicas. No sumar en la puntuación global.</p>
<p>11. Extinción-Negligencia-inatención.</p> <p>En pacientes en coma, puntuar "2."</p>	<p>0 = Sin alteraciones.</p> <p>1 = Inatención o extinción en una de las modalidades visual, táctil, espacial o corporal.</p> <p>2 = Hemi-inatención o negligencia severa, o a más de una modalidad. No reconoce su propia mano (asomatognosia) o sólo reconoce una parte del espacio.</p>

8.4 ANEXO IV: ESCALA RANKIN MODIFICADA

0.	Sin síntomas.	
1.	Sin incapacidad importante	Capaz de realizar sus actividades y obligaciones habituales.
2.	Incapacidad leve	Incapaz de realizar algunas de sus actividades previas, pero capaz de velar por sus intereses y asuntos sin ayuda.
3.	Incapacidad moderada	Síntomas que restringen significativamente su estilo de vida o impiden su subsistencia totalmente autónoma (p. ej. necesitando alguna ayuda).
4.	Incapacidad moderadamente severa	Síntomas que impiden claramente su subsistencia independiente aunque sin necesidad de atención continua (p. ej. incapaz para atender sus necesidades personales sin asistencia).
5.	Incapacidad severa	Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche.
6.	Muerte	

8.5 ANEXO V: COPIA DE LAS PUBLICACIONES

8.5.1 ARTÍCULO I. INSULIN RESISTANCE IS ASSOCIATED WITH A POOR RESPONSE TO INTRAVENOUS THROMBOLYSIS IN ACUTE ISCHEMIC STROKE

Diabetes Care. 2011; 34:2413-2417.

Pathophysiology/Complications

ORIGINAL ARTICLE

Insulin Resistance Is Associated With a Poor Response to Intravenous Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke

ANA I. CALLEJA, MD¹
 PABLO GARCÍA-BERMEJO, MD¹
 ELISA CORTIJO, MD¹
 ROSA BUSTAMANTE, MD²

ESTHER ROJO MARTÍNEZ, MD¹
 ENRIQUE GONZÁLEZ SARMIENTO, MD, PHD³
 ROSA FERNÁNDEZ-HERRANZ, MD, PHD¹
 JUAN F. ARENILLAS, MD, PHD¹

OBJECTIVE—Insulin resistance (IR) may not only increase stroke risk, but could also contribute to aggravate stroke prognosis. Mainly through a derangement in endogenous fibrinolysis, IR could affect the response to intravenous thrombolysis, currently the only therapy proved to be efficacious for acute ischemic stroke. We hypothesized that high IR is associated with more persistent arterial occlusions and poorer long-term outcome after stroke thrombolysis.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—This is a prospective, observational, longitudinal study in consecutive acute ischemic stroke patients presenting with middle cerebral artery (MCA) occlusion who received intravenous thrombolysis. Patients with acute hyperglycemia (≥ 155 mg/dL) receiving insulin were excluded. IR was determined during admission by the homeostatic model assessment index (HOMA-IR). Poor long-term outcome, as defined by a day 90-modified Rankin scale score ≥ 3 , was considered the primary outcome variable. Transcranial Duplex-assessed resistance to MCA recanalization and symptomatic hemorrhagic transformation were considered secondary end points.

RESULTS—A total of 109 thrombolysed MCA ischemic stroke patients were included (43.1% women, mean age 71 years). The HOMA-IR was higher in the group of patients with poor outcome ($P = 0.02$). The probability of good outcome decreased gradually with increasing HOMA-IR tertiles (80.6%, 1st tertile; 71.4%, 2nd tertile; and 55.3%, upper tertile). A HOMA-IR in the upper tertile was independently associated with poor outcome when compared with the lower tertile (odds ratio [OR] 8.54 [95% CI 1.67–43.55]; $P = 0.01$) and was associated with more persistent MCA occlusions (OR 8.2 [1.23–54.44]; $P = 0.029$).

CONCLUSIONS—High IR may be associated with more persistent arterial occlusions and worse long-term outcome after acute ischemic stroke thrombolysis.

Stroke is the second most common cause of death and the first leading cause of disability in adults worldwide. Moreover, stroke burden is expected to increase rapidly in the following decades (1). Approximately 85% of all strokes are ischemic, which are mainly caused by acute thromboembolic occlusion of intracranial arteries. In this context, reperfusion therapies focus on early vessel reopening to save cerebral ischemic

tissue-at-risk, thus reducing final infarct size and neurologic sequelae. Currently, intravenous thrombolysis with tissue plasminogen activator (tPA) remains the only therapy that has proved efficacy for acute ischemic stroke.

Insulin resistance (IR), the proposed main pathophysiological mediator of metabolic syndrome (2), may lead to a prothrombotic and proinflammatory state, characterized by a derangement in

endogenous fibrinolysis and increased platelet activation (3). These deleterious effects may contribute to explain the well-known association between raised IR and a higher incident or recurrent stroke (4), but whether IR-related metabolic disturbances may also have an impact on the prognosis of acute ischemic stroke once it has occurred and on the response to intravenous thrombolysis remains largely unknown. In this setting, our group previously reported that acute stroke patients fulfilling criteria for metabolic syndrome showed a higher resistance to intravenous thrombolysis (5,6). However, that study was based only on metabolic syndrome clinical criteria and no direct measure to assess IR was performed, thus we could not draw any valid conclusion regarding the relationship between IR and acute stroke outcome. Considering the pathophysiological background and our previous research, we designed a prospective study to test the hypothesis that a high IR is associated with a worse clinical outcome and more persistent arterial occlusions after intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Patient selection

We prospectively studied consecutive acute nonlacunar middle cerebral artery (MCA) ischemic stroke patients admitted to our Stroke Unit from 2008 January to 2010 July who fulfilled criteria to receive intravenous thrombolysis according to our institutional protocol in a standard dose of 0.9 mg/kg. Specific additional inclusion criteria for this study comprised 1) MCA occlusion on prebolus transcranial color coded Duplex (TCCD) examination, 2) availability of blood samples to determine fasting insulin 24 to 48 h after admission, 3) no chronic treatment with insulin before qualifying stroke, and 4) admission glycemia of < 155 mg/dL. This cutoff point of glycemia is used in our institutional protocol as a target for active treatment with insulin according to the results

From the ¹Department of Neurology, Stroke Unit, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, University of Valladolid, Valladolid, Spain; the ²Department of Biochemistry, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, University of Valladolid, Valladolid, Spain; and the ³Diabetes Unit-Department Internal Medicine, Department of Medicine, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, University of Valladolid, Valladolid, Spain.

Corresponding author: Ana I. Calleja, aicsarz@hotmail.com.

Received 30 June 2011 and accepted 2 August 2011.

DOI: 10.2337/dci11-1242

© 2011 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Insulin resistance and stroke thrombolysis

of the glycemia in acute stroke (GLIAS) study (7) and also in agreement with American Diabetes Association's consensus on inpatient glycemic control (8). The GLIAS study identified a glycemia ≥ 155 mg/dL as an independent predictor of poor outcome in acute stroke patients. By excluding patients with hyperglycemia >155 mg/dL in our study we intended to avoid exogenous insulin administration before blood sampling and also to attenuate the confounding effect of hyperglycemia on stroke outcome.

Between 2008 January and 2010 July, 193 ischemic stroke patients were treated with intravenous thrombolysis in our Stroke Unit. Of them, 41 were excluded because of their hyperglycemia at admission and 12 were not MCA territory ischemic strokes. Of the remaining 140, 115 showed MCA occlusions on prebolus TCCD examination. Finally, fasting insulin could be determined in 109 MCA ischemic stroke patients who could be included. The study protocol was approved by the local ethics committee, and informed consent to participate in our study was obtained from all patients or their relatives.

Clinical assessment

All included patients underwent medical history, physical examination, routine blood biochemistry and blood count, electrocardiogram (ECG), chest X ray, urgent cervical Duplex ultrasound and transcranial Doppler and/or Duplex examinations, and noncontrast brain computed tomography (CT) upon admission to our Stroke Unit. Intravenous thrombolysis was administered in a 0.9 mg/kg tPA dose as described in Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST) (9).

Prebolus systolic and diastolic blood pressure (BP) values, temperature, and glycemia were determined on admission. Neurologic examinations were performed on admission and periodically during the next 24 h after the initiation of the thrombolytic infusion. Stroke severity was determined with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) (10).

During admission, history of vascular risk factors and vascular disease was obtained. Cerebral CT scans were carried out before tPA bolus and repeated after 24 h, or earlier when neurologic deterioration occurred. Early ischemic changes in each patient's CT were evaluated according to Alberta Stroke Program Early CT

Score (ASPECTS) score (11). This is a 10-point quantitative topographic CT scan score developed to assess early ischemic changes on pretreatment CT studies in patients with acute ischemic stroke of the anterior circulation. A normal CT scan receives ASPECTS of 10 points, whereas a score of 0 indicates massive involvement throughout the MCA territory.

On follow-up CT we measured infarct volume by using the formula for irregular volumes and we also assessed the presence of symptomatic hemorrhagic transformation during admission, according to the SITS-MOST definition: local or remote parenchymal hemorrhage type 2—blood clot exceeding 30% of the infarct area, with substantial space occupation—on the imaging scan at 22–36 h after treatment, combined with a neurologic deterioration of four or more points on the NIHSS from baseline, or from the lowest NIHSS score between baseline and 24 h, or leading to death.

Stroke subtypes were classified using modified Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria (12), in agreement with the results of the additional diagnostic procedures performed (echocardiography, ECG–Holter monitor, special coagulation test, and immunologic study).

Clinical long-term outcome was assessed 90 days after symptoms onset by means of the modified Rankin Scale (mRS) (13). A mRS score ≤ 2 determined on day 90 after stroke onset was considered indicative of good long-term functional outcome.

Measurement of IR

IR was quantified with the homeostatic model assessment index (HOMA-IR) following the formula described by Matthews et al. (14): $HOMA-IR = \text{glucose mg/dL} \times \text{insulin mU/L} / 405$. Fasting blood samples were drawn 24–48 h after admission to our Stroke Unit. Serum was immediately separated by centrifugation at 3,500 revolutions per minute for 15 min. Right away the insulin level was measured with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ARCHITECT insulin assay; ABBOTT, Wiesbaden, Germany) and expressed in milliunits per liter; glucose was measured in serum using standardized methods and expressed in milligrams per deciliter. Determinations were performed in duplicate, and the mean value of both determinations was used. The mean intra-assay coefficients of variation were $<10\%$ in all cases.

Transcranial ultrasound assessment of resistance to clot lysis

All extracranial ultrasound imaging and transcranial Duplex were performed with a Toshiba Aplio XG echograph (Toshiba Medical Systems Europe, Zoetermeer, the Netherlands). Transcranial Doppler examinations were conducted with a power-M-mode-equipped Sonara device (Viason Healthcare). Standard transcranial Doppler (TCD) and/or TCCD examinations were performed in our Stroke Unit, right before tPA infusion to check the existence of MCA occlusion. If the patient had an inappropriate acoustic window, a single bolus of echocontrast agent (Sonovue) was administered. A follow-up TCD or TCCD study was performed by the same neurosonologist 1 h and 24 h after intravenous tPA bolus to monitor arterial status.

MCA occlusions were defined according to the Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) grading system (15), which establishes grade 0 (absent), 1 (minimal), 2 (blunted), or 3 (dampened) as indicative of arterial occlusion. Arterial recanalization was diagnosed when the end-diastolic flow velocity increased (TIBI grade 4) or became normal (TIBI grade 5). Resistance to clot lysis was defined by the lack of complete arterial recanalization (TIBI 4–5) in the 24-h control transcranial ultrasound examination.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (version 17.0; SPSS, Chicago, IL). Statistical significance for intergroup differences was assessed by the χ^2 test for categorical variables and the Student *t* test and Mann-Whitney *U* test for continuous variables. All continuous variables except NIHSS score, ASPECTS score, leukocyte, and platelet were normally distributed. Long-term clinical outcome was considered the primary outcome variable, whereas resistance to clot lysis, symptomatic hemorrhagic transformation, and final infarct volume were considered secondary end points. To evaluate the relationship between IR (HOMA-IR), poor clinical outcome, hemorrhagic transformation, infarct volume, and resistance to clot lysis, multivariate adjusted logistic regression models were applied when significant differences in respective bivariate analysis were observed. Variables showing a $P < 0.1$ on the respective bivariate analysis were included in those models. Moreover, we computed age-, sex-, and other significant variables—adjusted odds ratios (ORs) for poor clinical outcome and resistance to

Table 1—Demographic and baseline variables in the whole study sample and across the group of patients belonging to the top HOMA-IR tertile and remaining tertiles

Variables	All (n = 109)	Upper tertile (n = 38)	Rest of tertiles (n = 71)	P value
Sex, female (%)	47 (43.1)	18 (47.4)	29 (40.8)	0.512
Age (years)	71.0 ± 11.3	70.57 ± 12.49	71.23 ± 10.76	0.774
Smoking (%)	28 (25.7)	9 (23.7)	19 (26.8)	0.726
Ethanol abuse (%)	9 (8.3)	1 (2.6)	8 (11.3)	0.119
Hypertension (%)	68 (62.4)	25 (65.8)	43 (60.6)	0.591
Diabetes (%)	12 (11)	8 (21.1)	4 (5.6)	0.014
Hypercholesterolemia (%)	45 (41.3)	17 (44.7)	28 (39.4)	0.592
Cardioembolic etiology (%)	51 (46.8)	15 (39.5)	36 (50.7)	0.292
Baseline NIHSS score	10 (6–18.5)	10.5 (7.0–19.25)	10 (6–18)	0.610
Prebolus glycemia (mg/dL)	107.57 ± 21.76	114.81 ± 20.96	103.70 ± 21	0.010
Insulin levels (mU/L)	7.47 ± 10.19	13.01 ± 15.76	4.50 ± 1.85	0.003
Leukocyte (×10 ³ /μL)	7.96 (6.23–9.09)	8.69 (7.04–9.56)	7.10 (5.76–8.73)	0.007
Platelet (×10 ³ /μL)	202 (164–234)	206 (175–236)	195 (162–230)	0.298
Admission systolic BP (mmHg)	147.81 ± 23.84	151.42 ± 20.26	145.88 ± 25.49	0.250
Admission diastolic BP (mmHg)	78.44 ± 14.03	80.60 ± 13.57	77.28 ± 14.22	0.240
ASPECTS	10 (9.25–10)	10 (9–10)	10 (9.75–10)	0.970

Results are mean ± SD, No. (%), or median (interquartile range), as appropriate.

clot lysis associated with increasing tertiles of the population distribution HOMA-index, with the lower tertile as the reference. Results of the regression analyses are expressed as ORs and their corresponding CIs. A probability value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Descriptive analysis

We studied 109 consecutive acute ischemic stroke patients with a documented MCA occlusion and without the patient's hyperglycemia treated with intravenous tPA. Forty-seven (43.1%) of them were female, and mean age was 71.0 ± 11.3 years. Table 1 summarizes the distribution of demographic characteristics and baseline clinical variables in patients belonging to the HOMA-IR upper tertile subgroup and patients of remaining HOMA-IR tertiles. Univariate analysis showed that patients belonging to the HOMA-IR upper tertile had more frequently a history of diabetes ($P = 0.014$), higher glycemia on admission ($P = 0.01$), and higher leukocytes level ($P = 0.007$). However, there were no significant differences in main prognostic baseline variables across groups, including age and clinical severity as assessed by NIHSS.

IR and long-term outcome

Three months after stroke onset, six patients had died (mRS-score = 6) and we made a follow-up visit to all remaining

patients. Of them 34 (31.2%) had a mRS-score >2. HOMA-IR was higher in the poor outcome group (1.66 [95% CI 1.08–2.73]) than in the group of patients with good outcome (1.29 [0.81–1.88]; $P = 0.02$). The probability of good clinical outcome decreased gradually with increasing HOMA-IR tertiles (Fig. 1).

When a logistic regression model adjusted by age, baseline NIHSS, baseline glycemia, and ASPECTS was applied, a HOMA-IR in the upper tertile was independently associated with poor outcome when compared with the lower tertile (OR 8.54 [95% CI 1.67–43.55]; $P = 0.01$), as shown on Table 2.

Bivariate analysis also identified the female sex ($P = 0.026$), older age ($P = 0.034$), history of diabetes ($P = 0.005$),

higher baseline NIHSS score ($P < 0.001$), and platelet count ($P = 0.049$) as significantly associated with long-term poor clinical outcome as represented in Table 3. After adjustment for those variables with $P < 0.1$ on bivariate analysis, being in the upper HOMA-IR tertile remained as an independent predictor of poor outcome (adjusted OR 3.31 [95% CI 1.17–9.36]; $P = 0.024$). Other independent predictors of poor outcome were age and baseline stroke severity.

Relationship between HOMA-IR and secondary end points

Symptomatic hemorrhagic transformation.

No relationship was found between HOMA-IR and symptomatic hemorrhagic transformation (sHT; $P = 0.357$). No patients in the HOMA-IR lower tertile, 2 (5.7%) in the middle tertile, and 1 (2.8%) in the upper tertile developed sHT.

Resistance to intravenous thrombolysis.

Control TCD or TCCD to assess MCA status at 24 h was performed in 89 of 109 patients. Resistance to clot lysis was observed in 19 (21.3%) of them. HOMA-IR was significantly higher in those patients with persistent MCA occlusion 24 h after tPA bolus: OR 1.87 [95% CI 1.19–3.6] vs. 1.33 [0.8–2.00], $P = 0.035$. Having a HOMA-IR in the upper tertile level was associated with more persistent arterial occlusions after thrombolysis. The probability of resistance to clot lysis augmented gradually with increasing HOMA-IR tertiles (7% 1st tertile, 25% 2nd tertile, and 30% upper tertile).

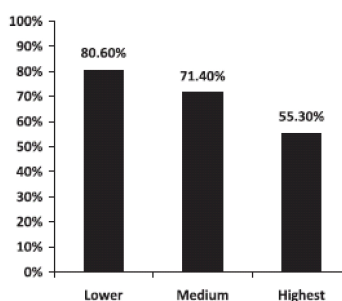


Figure 1—Relation between IR and long-term clinical outcome. Bars show the probability of achieving good clinical outcome across HOMA-IR tertiles.

Insulin resistance and stroke thrombolysis

Table 2—HOMA-IR tertiles and long-term clinical outcome

HOMA-IR tertiles	Poor outcome OR	P value
Tertile		
Lower: <1.03	Reference	
Middle: 1.03–1.71	2.96 [0.61–14.4]	0.178
Upper: >1.71	8.54 [1.67–43.35]	0.01

Results show age-, baseline NIHSS-, baseline glycemia-, and ASPECTS-adjusted odds ratio (OR) and 95% CI for poor long-term clinical outcome associated with increasing HOMA-IR tertiles, using the lower tertile as the reference.

A logistic regression analysis, in which adjustment for age, baseline NIHSS, prebolus glycemia, and ASPECTS was conducted, showed that having a HOMA-IR in the upper tertile, as compared with the lower tertile, meant an eightfold increase in the probability of resistance to clot lysis 24 h after tPA infusion (adjusted OR 8.2 [95% CI 1.23–54.44]; $P = 0.029$).

Infarct volume. Patients in the upper IR tertile showed a clear trend toward higher final infarct volumes, although it did not reach statistical significance (48.1 ± 83.4 cc in upper tertile vs. 24.83 ± 44.12 cc in the rest of tertiles; $P = 0.061$).

CONCLUSIONS—In our previous works, we found metabolic syndrome to be associated with a higher resistance to intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke (5,6). As a potential explanation for this observation, we hypothesized that the prothrombotic metabolic alterations related to IR, such as the derangement in endogenous fibrinolysis, could be

mediating this effect. However, in those studies we approached IR relying only on the clinical definition of metabolic syndrome, and no direct measure of IR was performed. Thus, the current study was designed to test this hypothesis more solidly using the HOMA-IR to directly quantify IR, which is known to provide a useful model to assess IR and β -cell function in epidemiological studies (16). In our new series of prospectively selected consecutive acute MCA ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis, a higher IR was associated with a worse long-term functional outcome and with more lasting MCA occlusions, being this association independent of baseline clinical severity and glycemia.

Previous studies in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis have stressed the importance of achieving arterial recanalization as soon as possible in to improve clinical outcome (17). In this context, IR could antagonize the effect of systemic thrombolysis by

several potential mechanisms. First, patients with higher IR have elevated blood level of fibrinolysis inhibitors, such as plasminogen activator inhibitor 1, which may reflect an impairment of endogenous fibrinolytic capacity (18). Second, IR may affect the structure of the offending clot itself, rendering the clot more dense and resistant to lysis. Ex vivo studies in human clots have shown that the density of the clot augments with the increasing number of components of the metabolic syndrome (19). Moreover, the clots obtained from patients with metabolic syndrome are composed of thicker fibers and have more prolonged lysis times than the ones from individuals without increased IR (20). Third, IR may promote various conditions that could contribute to worsen the response to intravenous thrombolysis and stroke outcome in general, such as increased platelet activation, endothelial dysfunction, and a chronic proinflammatory state, among others (3). As an important practical implication of our findings, acute ischemic stroke patients with higher IR may be bad responders to intravenous thrombolysis and could benefit from more aggressive reperfusion approaches such as direct or rescue neuro-interventional procedures.

The results of our study support the notion that IR itself, independently of glycemia, may exert a deleterious effect in acute ischemic stroke. Indeed, hyperglycemia is known to be a strong determinant of poor stroke outcome in patients treated with intravenous thrombolysis by several putative mechanisms (21). To avoid

Table 3—Results of the bivariate analysis of variables associated with poor long-term clinical outcome

Variable	Good outcome at 3 months (n = 75)	Poor outcome at 3 months (n = 34)	P value
Sex, female (%)	27 (36)	20 (55.8)	0.026
Age (years)	69.46 \pm 11.4	74.41 \pm 10	0.034
Smoking (%)	19 (25.3)	9 (26.5)	0.900
Alcohol (%)	7 (9.3)	2 (5.9)	0.544
Hypertension (%)	46 (61.3)	22 (64.7)	0.736
Diabetes (%)	4 (5.3)	8 (23.5)	0.005
Hypercholesterolemia (%)	32 (42.7)	13 (38.2)	0.663
Cardioembolic etiology (%)	33 (44)	18 (52.9)	0.443
Baseline NIHSS score	9.81 (5–13)	19 (12.50–22)	<0.001
Prebolus glycemia (mg/dL)	105.14 \pm 21.99	112.94 \pm 20.56	0.083
HOMA-IR	1.29 (0.81–1.88)	1.66 (1.08–2.73)	0.02
Leukocyte ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.52 (6.22–8.76)	8.60 (6.45–10.26)	0.680
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	193 (162–232)	214 (191–257)	0.049
Admission systolic BP (mmHg)	145.46 \pm 24.13	153.0 \pm 22.7	0.127
Admission diastolic BP (mmHg)	78.74 \pm 13.30	77.76 \pm 15.70	0.737
Admission temperature ($^{\circ}\text{C}$)	35.74 \pm 0.60	35.71 \pm 0.59	0.858
ASPECTS	10 (10–10)	10 (8.5–10)	0.267

Results are mean \pm SD, No. (%), or median (interquartile range), as appropriate. Results of multivariate analysis are shown in text.

the confounding influence of glycemia, patients presenting with acute hyperglycemia were excluded from our study. Despite having excluded hyperglycemic patients, IR still emerged as an independent predictor of a worse response to thrombolysis after adjustment for baseline glycemia in logistic regression models. In agreement with this finding, it has been shown in healthy humans that hyperinsulinemia may cause a selective impairment of fibrinolysis independent of glucose level (22).

This study has some limitations. First, the final sample was a small size, although highly selected, and therefore our results would need to be confirmed in a validation sample. Second, we used the HOMA-IR to quantify IR and not the gold standard hyperinsulinemic-euglycemic clamp because of practical limitations derived from our clinical setting. However, our selected method has been shown to correlate reasonably well with clamp-derived values (14). Third, fasting blood samples used to determine HOMA-IR were obtained during the first 24 to 48 h after stroke onset and only once. We had to assume that HOMA-IR measured during admission in acute stroke patients may reflect differences in their prestroke IR status, since quantification of prestroke IR was not available. We cannot completely rule out that our values are affected by acute phase response and are therefore less valid as an estimate of prestroke IR. Nevertheless, our mean HOMA-IR values are comparable or even somewhat lower than the ones reported in the chronic phase after stroke, which argues against a substantial influence of acute phase reaction in our results (24).

In conclusion, high IR is associated with a worse response to intravenous thrombolysis in acute MCA ischemic stroke. IR may lead to a derangement of endogenous fibrinolysis, increased clot density, and prolonged lysis times as reflected by more persistent arterial occlusions, thus becoming a promising therapeutic target.

Acknowledgments—A.I.C. was the recipient of a research grant from Instituto de Salud Carlos III (Río Hortega program), Ministry of Science, Spain (2008-2011), which was co-funded between Instituto de Salud Carlos III and Hospital Clínico Universitario, Salud Castilla y León (SACYL); Department of Health, Castilla y León (SACYL); Gerencia Regional de Salud, Castilla y León (SACYL).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

A.I.C. contributed to the study design, patient selection, clinical work, neurosonology,

data collection, analysis and interpretation, and writing of the manuscript. P.G.-B. and E.C. contributed to patient selection, clinical work, neurosonology, and data collection. R.B. contributed to blood sampling and laboratory work. E.R.M. contributed to patient selection, clinical work, and neurosonology. E.G.S. and R.F.-H. contributed comments to the manuscript. J.F.A. contributed to the study design, patient selection, clinical work, neurosonology, data collection, analysis and interpretation, and writing of the manuscript.

The authors thank Rosa Alcaide and Edita Sánchez on behalf of the nursing staff of the Stroke Unit, without whom completion of this study would have never been possible.

References

1. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 2009;8:355–369
2. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2289–2304
3. Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemostasis* 2008;99:995–1000
4. Arenillas JF, Moro MA, Dávalos A. The metabolic syndrome and stroke: potential treatment approaches. *Stroke* 2007;38:2196–2203
5. Arenillas JF, Ispuerto L, Millán M, et al. Metabolic syndrome and resistance to IV thrombolysis in middle cerebral artery ischemic stroke. *Neurology* 2008;71:190–195
6. Arenillas JF, Sandoval P, Pérez de la Ossa N, et al. The metabolic syndrome is associated with a higher resistance to intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in women than in men. *Stroke* 2009;40:344–349
7. Fuentes B, Castillo J, San José B, et al.; Stroke Project of the Cerebrovascular Diseases Study Group, Spanish Society of Neurology. The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: the Glycemia in Acute Stroke (GLIAS) study. *Stroke* 2009;40:562–568
8. Moghissi ES, Korytkowski MT, DiNardo M, et al.; American Association of Clinical Endocrinologists; American Diabetes Association. American Association of Clinical Endocrinologists and American Diabetes Association consensus statement on inpatient glycemic control. *Diabetes Care* 2009;32:1119–1131
9. Wahlgren N, Ahmed N, Eriksson N, et al.; Safe Implementation of Thrombolysis in

- Stroke-MONITORING Study Investigators. Multivariable analysis of outcome predictors and adjustment of main outcome results to baseline data profile in randomized controlled trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONITORING Study (SITS-MOST). *Stroke* 2008;39:3316–3322
10. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989;20:864–870
 11. 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
 12. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, 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
 13. 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
 14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419
 15. Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, et al. Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2001;32:89–93
 16. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1997;20:1087–1092
 17. Molina CA, Montaner J, Abilleira S, et al. Time course of tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute cardioembolic stroke: a case-control study. *Stroke* 2001;32:2821–2827
 18. Palomo I, Alarcón M, Moore-Carrasco R, Argilés JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome (Review). *Int J Mol Med* 2006;18:969–974
 19. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ; EuroCLOT Investigators. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2783–2789
 20. Collet JP, Park D, Lesty C, et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1354–1361

Insulin resistance and stroke thrombolysis

21. Alvarez-Sabín J, Molina CA, Montaner J, et al. Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator-treated patients. *Stroke* 2003;34:1235–1241
22. Stegenga ME, van der Crabben SN, Levi M, et al. Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans. *Diabetes* 2006;55:1807–1812
23. Rundek T, Gardener H, Xu Q, et al. Insulin resistance and risk of ischemic stroke among nondiabetic individuals from the northern Manhattan study. *Arch Neurol* 2010;67:1195–1200

8.5.2 ARTÍCULO II. BLOOD BIOMARKERS OF INSULIN RESISTANCE IN ACUTE STROKE PATIENTS TREATED WITH INTRAVENOUS THROMBOLYSIS: TEMPORAL PROFILE AND PROGNOSTIC VALUE

Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism. En prensa.

Journal of

Diabetes Research & Clinical Metabolism

HOAJ

Herbert Open Access Journals

Original

Open Access

Blood biomarkers of insulin resistance in acute stroke patients treated with intravenous thrombolysis: Temporal profile and prognostic value

Ana I. Calleja^{1*}, Elisa Cortijo¹, Pablo García-Bermejo¹, Javier Reyes RN¹, Jesús F. Bermejo², M. Fe Muñoz BS², Rosario Fernández-Herranz¹ and Juan F. Arenillas¹

*Correspondence: aicsanz@hotmail.com

¹Stroke Unit, Department of Neurology and ²Biomedic Investigation Unit (IBC).

Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Department of Medicine, University of Valladolid. Valladolid, Spain.

Institutional addresses: Avda. Ramón y Cajal, 3; 47005; Valladolid, Spain.

Abstract

Background: Metabolic syndrome and insulin resistance may hamper the beneficial effect of intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. We investigated the temporal profile and prognostic value of 11 circulating biomarkers of insulin resistance in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis.

Methods: We performed a prospective study in acute ischemic stroke patients with a middle cerebral artery (MCA) occlusion who received intravenous tissue plasminogen activator (tPA). Measurement of C-Peptide, Ghrelin, Gastric-inhibitory-polypeptide (GIP), Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1), Glucagon, Insulin, Leptin, Resistin, Visfatin, Interleukin-6 (IL-6) and Tumor-necrosis-factor-alpha (TNF- α) was performed in three time-points: before tPA-bolus, right after tPA-infusion and at 24h. Long term clinical outcome, early neurological recovery, MCA-recanalization, infarct volume and hemorrhagic transformation were outcome variables.

Results: Fifty-two patients were included (61%women, mean-age75). Three months after stroke onset, 24 (47%) patients were functionally independent. In a multivariate adjusted regression model, GIP level at 1h \geq 109.51 pg/ml (OR 13.78 [1.38-137.31], p=0.02) and GIP level at 24h \geq 82.19 pg/ml (OR 28.46 [1.09-739.82], p=0.04) emerged as independent predictors of good outcome. Baseline GIP and 0-1 h increment in IL-6 and TNF- α were associated with early neurological course. Ghrelin level at 1h and 0-24h increment in Leptin level were independently associated with a larger infarct volume.

Conclusions: Blood concentration of several molecules reflecting a more pronounced insulin resistance status was associated with a worse outcome in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis. Noteworthy, a higher GIP level at 1h and 24 h after tPA treatment predicted good long-term outcome.

Key words: Insulin resistance, acute stroke, cytokines.

Introduction

Stroke is a major cause of death and disability worldwide. Acute reperfusion therapies are aimed to reduce the amount of brain infarcted tissue, thus improving stroke outcome. Among reperfusion therapies, intravenous thrombolysis still represents the only treatment that has proven to be safe and effective in randomized clinical trials. These trials have shown that intravenous tissue plasminogen activator (tPA) improves functional outcome in ischemic stroke and that the benefits outweigh the risk for patients who receive treatment within 4.5 hours of symptoms onset. Results from the NINDS trial showed that intravenous alteplase improves functional outcome at three months, if given within 3 hours of symptom onset [1]. The ECASS 3 clinical trial found that intravenous alteplase is beneficial when given from 3 to 4.5 hours after stroke onset [2]. However, the beneficial effect of stroke thrombolysis can be hampered by several local and systemic factors, among which

the metabolic syndrome has gained attention recently [3,4]. Our group previously reported that insulin resistance, the proposed key pathophysiological mechanism underlying metabolic syndrome [5], is associated with a worse response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke [6]. In that study, insulin resistance was measured by means of the HOMA index calculated during admission. This approach has the risk of a confounding effect caused by the deleterious role of fasting glycemia included in the HOMA equation [7]. Therefore, we decided to explore the role of other glycemia-independent markers of insulin resistance in acute ischemic stroke, thus ruling out the potential bias caused by the association between 24 hours-glycemia and stroke outcome [8].

Insulin resistance is associated with an increased release and action of several adipose-derived cytokines, the so-called adipokines. These adipokines have been involved in the impairment of insulin sensitivity and exert important actions

on vessel function and metabolic regulation, thanks to their autocrine and paracrine function [9]. These molecules affect platelet function, coagulation and fibrinolysis, and their increased release may contribute to a prothrombotic and systemic inflammatory state [10]. Whereas a significant number of studies have examined the association of adipokines with incident coronary heart disease [11,12], only a limited number of studies have so far investigated the role of adipokines in ischemic stroke [13]. Most of these studies have evaluated the association between a single adipokine and the risk of having an ischemic stroke in the future [14,15]. However, the role of insulin-resistance-related biomarkers in the response to acute ischemic stroke therapies remains largely unexplored.

Considering our previous research, we designed a prospective study aimed to describe the temporal profile of several insulin-resistance-related molecules during the acute phase of ischemic stroke and to investigate their effect on patients' outcome after intravenous tPA therapy.

Methods

Patient selection

We prospectively studied acute nonlacunar middle cerebral artery (MCA) ischemic stroke patients admitted to our Stroke Unit from September 2009 to July 2011, who had a documented MCA occlusion on prebolus transcranial color coded Duplex (TCCD) examination and fulfilled criteria to receive intravenous thrombolysis according to our institutional protocol. Besides thrombolysis criteria, specific criteria to enter this study were (1) absence of conditions that could affect biomarker levels such as active neoplasm or prior inflammatory diseases, (2) possibility to obtain and process blood samples prior to tPA bolus and at 1 and 24 hours after thrombolysis was started, (3) patient's functional independence prior to stroke, as defined by a modified Rankin scale (mRS) score of 0 or 1, and (4) informed consent obtained from patient or relatives.

During the study period, 52 ischemic stroke patients with an acute TCCD-documented MCA occlusion and treated with intravenous tPA fulfilled all selection criteria and were included in the study. The study protocol was approved by the local ethics committee.

Clinical assessment

All included patients underwent medical history, physical examination, routine blood biochemistry and blood count, electrocardiogram (ECG), chest X ray, urgent cervical Duplex ultrasound, transcranial Duplex examinations, and noncontrast brain computed tomography (CT), upon admission to our Stroke Unit. Intravenous thrombolysis was administered in a 0.9 mg/kg tPA dose as described in Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST) [16]. Prebolus systolic and diastolic blood pressure (BP) values, temperature, and glycemia were determined on admission.

Twenty-four hours glycemia were determined in fasting blood sample. Neurologic examinations were performed on admission and periodically during the next 24 h after the initiation of the thrombolytic infusion. Stroke severity was determined with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) [17]. We defined "early neurological improvement" as a reduction in the total NIHSS score by ≥ 4 points or the complete resolution of the neurologic deficit at 24 hours, based on the methods used in previous studies [1].

During admission, history of vascular risk factors and vascular disease was obtained. Cerebral CT scans were carried out before tPA bolus and repeated after 24 h, or earlier when neurologic deterioration occurred. Early ischemic changes in each patient's CT were evaluated according to the Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) [18]. This is a 10-point quantitative topographic CT scan score developed to assess early ischemic changes on pretreatment CT studies in patients with acute ischemic stroke of the anterior circulation. A normal CT scan receives ASPECTS of 10 points, whereas a score of 0 indicates massive involvement throughout the MCA territory. On follow-up CT we measured infarct volume by using the formula for irregular volumes and we also assessed the presence of symptomatic hemorrhagic transformation (SHT) during admission, according to the SITS-MOST definition [19]. Stroke subtypes were classified using modified Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria [20], in agreement with the results of the additional diagnostic procedures performed (echocardiography, ECG-Holter monitor, special coagulation test, and immunologic study).

Clinical long-term outcome was assessed 90 days after symptoms onset by means of the mRS [21]. A mRS score ≤ 2 determined on day 90 after stroke onset was considered indicative of good long-term functional outcome.

Laboratory methods

Blood samples were drawn right before tPA-bolus, right after tPA infusion and 24h after admission to our Stroke Unit. Blood was also obtained from 10 healthy volunteers without history of stroke or other vascular diseases, who served as laboratory controls to obtain reference values. Plasma was collected by centrifugation at 3.000 rpm for 15 min at 4°C, aliquoted and stored blind-coded at -80°C until analysis. Biomarker levels in plasma were measured in patients and controls by using the multiplex Bio-Rad assay (Hercules, CA, USA), "Bio-Plex HU Diabetes 12", at the Biomedical Investigation Unit (IBC), HCUV, Valladolid, Spain. This system allows for quantitative measurement of 12 different mediators (C-Peptide, Ghrelin, Gastric inhibitory polypeptide (GIP), Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), Glucagon, Insulin, Leptin, Resistin, Visfatin, Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)). Concentrations were given in pg/ml for all molecules. Determinations were done by duplicate. Mean coefficients of variation were < 10% in all replicated samples. Results related to PAI-1 are not shown as they are

reserved for another publication using different methodology.

Transcranial ultrasound assessment of resistance to clot lysis

All extracranial ultrasound imaging and transcranial Duplex were performed with a Toshiba Aplio XG echograph (Toshiba Medical Systems Europe, Zoetermeer, the Netherlands). TCCD examinations were performed in our Stroke Unit, right before tPA infusion to check the existence of MCA occlusion. If the patient had an inappropriate acoustic window, a single bolus of echocontrast agent (Sonovue) was administered. A follow-up TCCD study was performed by the same neurosonologist 2h after intravenous tPA bolus to monitor arterial status. MCA occlusions were defined according to the Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) grading system [22], which establishes grade 0 (absent), 1 (minimal), 2 (blunted), or 3 (dampened) as indicative of arterial occlusion. Early arterial recanalization was diagnosed when the TIBI pattern reached a 4 or 5 grade in the 2 hours control TCCD examination.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (version 18.0; SPSS Inc, Chicago Ill). Statistical significance for intergroup differences was assessed by the χ^2 test for categorical variables and the Student t test and Mann-Whitney U test for continuous variables. All continuous variables except NIHSS score, ASPECTS score, leukocyte and platelet were normally distributed. Non parametric tests were used for molecule analysis. Protein concentrations required a log transformation to satisfy the linearity assumption. Mediators' levels were first compared between patients and controls using Mann-Whitney U-test. Variation of protein concentration during the first 24 hours was assessed by means of Friedman and Wilcoxon tests. Bonferroni correction was used for multiple comparisons and a probability value <0.016 was considered statistically significant.

Long term clinical outcome, early neurological recovery, early MCA recanalization, infarct volume and hemorrhagic transformation were considered outcome variables. The relationship between mediators levels and stroke outcome was analyzed in several steps. First, to evaluate the relationship between every biomarker level (including their variation in concentration from baseline to the 24 hour time-point) and outcome variables, crude logistic regression models were applied. Molecules showing a $p \leq 0.2$ on the respective crude logistic regression analysis were included in a multivariate regression model, and adjustment was done by all baseline variables showing a $p \leq 0.1$ on the respective bivariate analyses. Results of the regression analyses are expressed as odds ratios (ORs) and their corresponding confidence intervals (CI). Second, receivers operating characteristic (ROC) curves were calculated for molecules showing a $p \leq 0.1$ on the multivariate adjusted logistic regression models, in order to determine their predictive value under the curve as well as to obtain

the cut-point that better discriminated between favorable and unfavorable stroke outcome. For all tests, a probability value <0.05 was considered statistically significant.

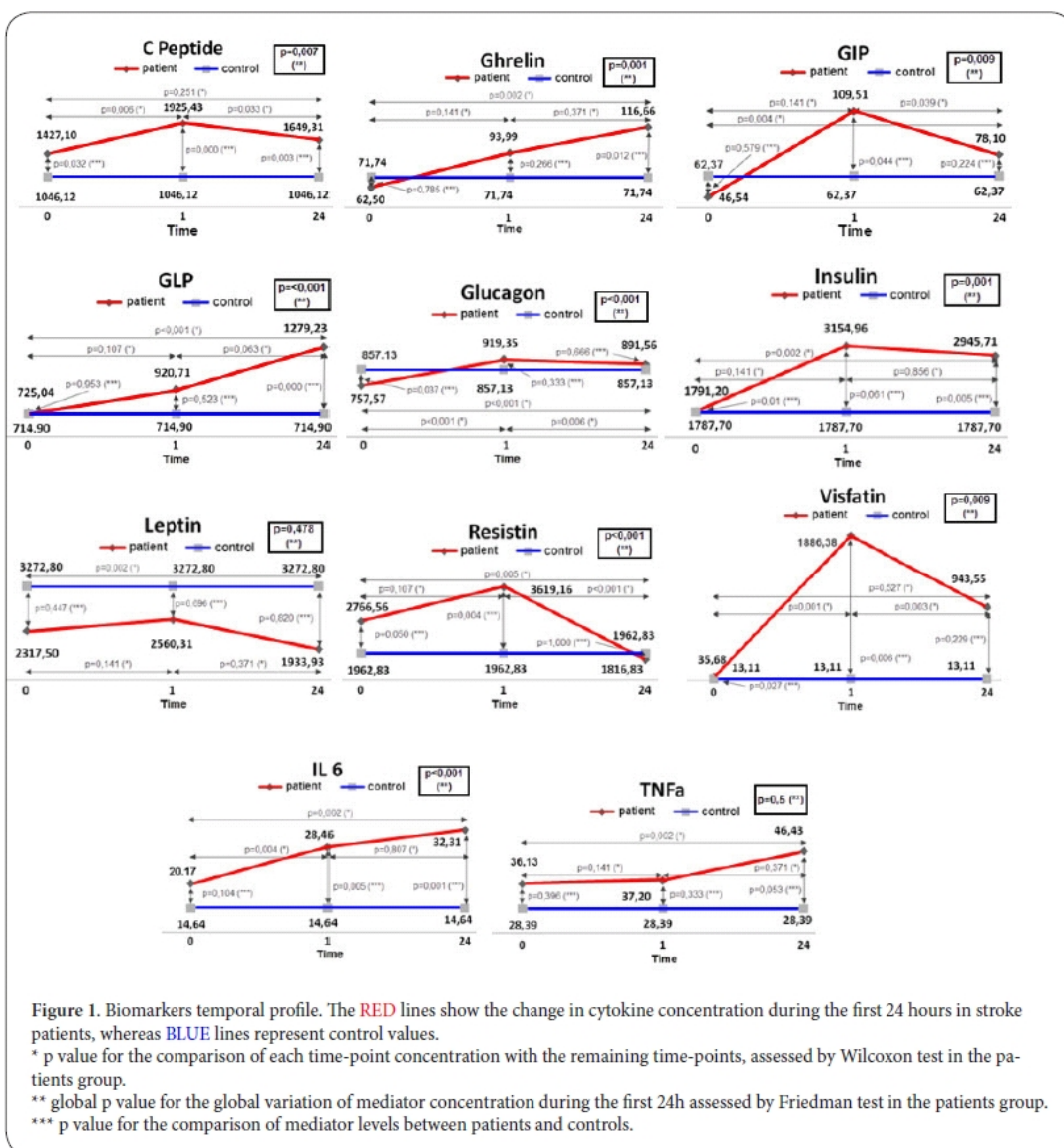
Results

Descriptive analysis and temporal profile of insulin resistance related- biomarkers

We studied 52 consecutive acute ischemic stroke patients with a documented MCA occlusion treated with intravenous tPA. Of them 32(61.53%) were female, mean age was 75.38 \pm 8.89 years and median NIHSS was 15 (9-21). **Table 1** summarizes the

Table 1: Distribution of demographic characteristics, baseline clinical variables and cytokine levels. Results are mean \pm SD, No. (%), or median (interquartile range), as appropriate. SBP: Systolic Blood pressure. DBP: Diastolic blood pressure. ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT Score.

VARIABLE	
Sex, female	32 (61.5%)
Age, y	75.38 \pm 8.89
Smoking	11 (21.2%)
Hypertension	32 (61.5%)
Diabetes mellitus	6 (11.5%)
Hypercholesterolemia	15 (28.8%)
Cardioembolic etiology	24 (46.2%)
Baseline NIHSS score	15 (9-21)
Pre-bolus glycemia, mg/dL	119.07 \pm 27.86
24h fasting glycemia,mg/dL	107.25 \pm 33.61
Leukocyte, x103/ μ l	8.15 (6.43-9.28)
Platelet, x103/ μ l	193 (165-229)
Admission SBP, mm Hg	153.42 \pm 17.16
Admission DBP, mm Hg	79.98 \pm 10.67
ASPECTS	9 (8-10)
C_Peptide_0h, pg/ml	1427.10 (1161.46 - 2032.30)
C_Peptide_1h, pg/ml	1925.43 (1471.33 - 2818.98)
C_Peptide_24h, pg/ml	1649.31 (1209.86 - 2173.72)
Ghrelin_0h, pg/ml	62.50 (38.77 - 135.74)
Ghrelin_1h, pg/ml	93.99 (51.40 - 156.83)
Ghrelin_24h, pg/ml	116.66 (84.62 - 150.83)
GIP_0h, pg/ml	46.54 (25.44 - 118.08)
GIP_1h, pg/ml	109.51 (63.51 - 194.32)
GIP_24h, pg/ml	78.10 (58.67 - 133.88)
GLP-1_0h, pg/ml	725.04 (545.93 - 1002.32)
GLP-1_1h, pg/ml	920.71 (459.09 - 1550.04)
GLP-1_24h, pg/ml	1279.23 (1007.16 - 1892.57)
Glucagon_0h, pg/ml	757.57 (624.91 - 855.62)
Glucagon_1h, pg/ml	919.35 (805.26 - 1105.59)
Glucagon_24h, pg/ml	891.56 (805.57 - 990.46)
Insulin_0h, pg/ml	1791.20 (1252.83 - 2731.15)
Insulin_1h, pg/ml	3154.96 (1559.37 - 5279.02)
Insulin_24h, pg/ml	2945.71 (2303.15 - 4827.09)
Leptin_0h, pg/ml	2317.50 (1463.35 - 4120.33)
Leptin_1h, pg/ml	2560.31 (1370.97 - 3990.47)
Leptin_24h, pg/ml	1933.93 (1307.49 - 5403.32)
Resistin_0h, pg/ml	2766.56 (1929.42 - 5640.59)
Resistin_1h, pg/ml	3619.16 (2090.16 - 12247.91)
Resistin_24h, pg/ml	1816.83 (1411.92 - 3251.75)
Visfatin_0h, pg/ml	35.68 (35.68 - 1918.54)
Visfatin_1h, pg/ml	1886.38 (35.68 - 7853.48)
Visfatin_24h, pg/ml	943.55 (12.40 - 1727.51)
IL6_0h, pg/ml	20.17 (14.86 - 31.44)
IL6_1h, pg/ml	28.46 (19.71 - 39.57)
IL6_24h, pg/ml	32.31 (22.63 - 48.08)
TNFa_0h, pg/ml	36.13 (26.27 - 54.19)
TNFa_1h, pg/ml	37.20 (22.83 - 66.67)
TNFa_24h, pg/ml	46.43 (33.71 - 59.33)

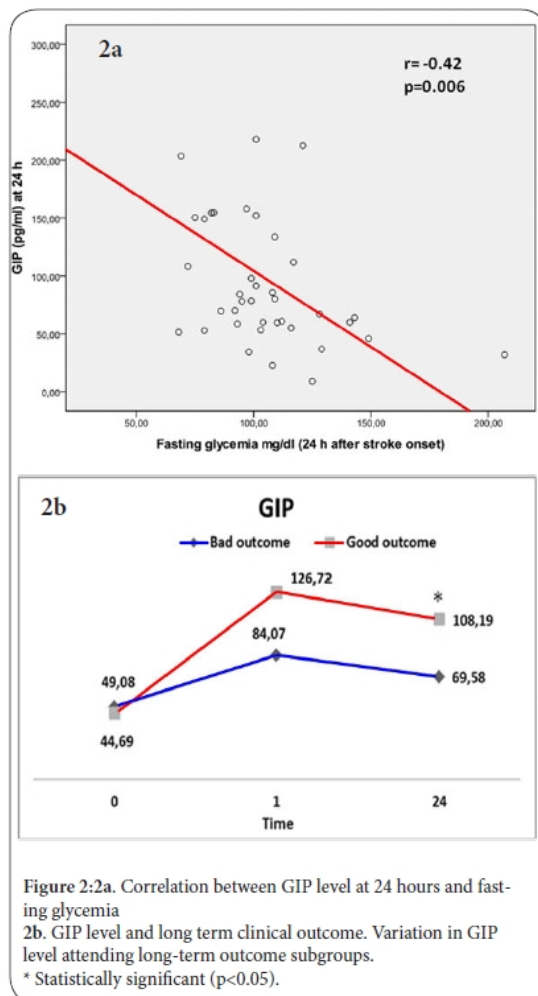


distribution of demographic characteristics, baseline clinical variables and molecules level.

Studied biomarkers level was higher in stroke patients than in healthy controls for most molecules and in most time-points, with the exception of Leptin. Regarding biomarker variation during the first 24 hours, most molecules experienced a progressive increment, some of them (C-Peptide, GIP, Glucagon, Insulin, Resistin and Visfatin) picking at the first hour and then

decreasing until the 24 hour timepoint. The time profile of the studied biomarkers is shown on Figure 1.

No significant correlations were found between the baseline level of any molecule and admission's glycemia. Regarding 24-hours glycemia, significant correlations were found for GIP level at 24 hours ($r=-0.42$, $p=0.006$) (Figure 2a), C-Peptide at 24 hours ($r=-0.35$, $p=0.02$), 24- hours Ghrelin ($r=-0.34$, $p=0.03$), 24-hours GLP1 ($r=-0.43$, $p=0.006$), 1-hour



Resistin ($r=0.37$, $p=0.01$) and Glucagon increment during the first 24h ($r=0.36$, $p=0.02$).

Association between molecule concentration and endpoint variables

Long term clinical outcome

Three months after stroke onset, 24 (47%) patients had a good outcome (mRS score ≤ 2). Bivariate analysis, shown on **Table 2**, identified higher baseline NIHSS score ($P < 0.001$), lower baseline NCCT ASPECTS ($p=0.002$) and higher admission DBP ($p=0.02$) as significantly associated with a long-term poor clinical outcome. The concentration of the following biomarkers, analyzed as continuous variable, was significantly associated with long-term clinical outcome in the bivariate analyses: 24h-

Table 2: Results of the bivariate analysis of baseline clinical variables associated with poor long-term clinical outcome.

Results are mean \pm SD, No. (%), or median (interquartile range), as appropriate. SBP: Systolic Blood pressure. DBP: Diastolic blood pressure. ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT Score

VARIABLE	Good outcome at 3 months (n=24)	Poor outcome at 3 months (n=27)	P Value
Sex, female	13 (54.16%)	19 (70.37%)	0.23
Age, y	76.54 \pm 8.56	74.22 \pm 9.33	0.36
Smoking	5 (20.83%)	6 (22.22%)	0.90
Alcohol	1 (4.16%)	3 (11.11%)	0.24
Hypertension	15 (62.5%)	17 (62.96%)	0.26
Diabetes mellitus	1 (4.16%)	5 (18.51%)	0.11
Hypercholesterolemia	7 (29.16%)	8 (29.62%)	0.97
TOAST category	-	-	0.12
CE	8 (33.33%)	16 (59.25%)	-
ATH	5 (20.83%)	5 (18.51%)	-
IND	11 (45.83%)	5 (18.51%)	-
Others	0 (0%)	1 (3.70%)	-
Baseline NIHSS score	10 (6-14)	19 (15-22)	<0.001
Basal glycemia, mg/dL	111.83 \pm 24.28	125.18 \pm 30.18	0.091
24h fasting glycemia, mg/dL	94.50 \pm 23.01	120.22 \pm 38.88	0.50
Leukocyte, x103/ μ l	7870 (6430-8680)	8730 (6290-9800)	0.32
Platelets, x103/ μ l	197000 (166500-219500)	193000 (158000-230000)	0.96
Admission SBP, mm Hg	150.58 \pm 16.6	155.37 \pm 17.68	0.32
Admission DBP, mm Hg	76.58 \pm 11.14	83.25 \pm 9.48	0.02
ASPECTS	10 (8-10)	8 (7-9)	0.002

GIP, 1h-Resistin, 1h-Visfatin, GIP, Insulin and Leptin variation during the first 24h, and Visfatin increment during the first hour. These associations did not resist multivariate adjustment for those variables with $p < 0.1$ on bivariate analysis (See additional **table 1**). Among molecules showing a $p \leq 0.1$ on the multivariate adjusted logistic regression model, only 1h-GIP, 24h-GIP and 1h-Visfatin exhibited area under ROC (AUROC) values above 0.6. A level of 109.5 pg/ml for 1h-GIP and 82.19 pg/ml for 24h-GIP emerged as the best cutoff values ((sensitivity 71%; specificity 70%) (sensitivity 61%; specificity 77%) respectively). GIP level at 1 and 24 hour higher than the selected cutoff values emerged as independent predictors of good outcome (OR 13.78 [95% CI 1.38-137.31], $p=0.02$ and OR 28.46 [95% CI 1.09-739.82], $p=0.04$ respectively), being these associations independent of admission and 24 hours glycemia. **Figure 2b** shows the variation in GIP level attending long-term outcome subgroups.

Early neurological improvement

Twenty four hours after stroke onset, 21 (40.38%) patients

experienced early clinical improvement. The multiple logistic regression analysis adjusted for those variables with $p < 0.1$ on bivariate analysis (platelets $p = 0.04$ and admission diastolic BP (DBP) $p = 0.06$), identified admission GIP (OR 4.47 [95% CI 1.08-18.51], $p = 0.03$), IL6 (0h-1h) (OR 0.06 [95% CI 0.005-0.73], $p = 0.02$), and TNF- α (0h-1h) (OR 0.13 [95% CI 0.02-0.91], $p = 0.04$), as significantly associated with neurological improvement. Among molecules showing a $p \leq 0.1$ on the multivariate adjusted logistic regression model, only baseline GIP and 24h-GIP exhibited AUROC values above 0.6. A level of 84.91 pg/ml for 24h-GIP emerged as the best cutoff value (sensitivity 55%; specificity 72%). GIP level at 24 hour higher than the selected cutoff value was an independent predictor of early neurological recovery (OR 5.76 [95% CI 1.27-26.16], $p = 0.02$).

Recanalization by TCCD

Control TCCD to assess MCA status at 2 hours was performed in 41/52 patients. Early MCA recanalization was observed in 15 (36%). No significant relationship was found between molecules concentration and the probability of MCA recanalization.

Infarct volume

Median infarct volume measured on follow up CT was 28.8cc (4.43cc-79cc). Linear regression analysis showed that baseline NIHSS ($p < 0.001$), ASPECTS ($p < 0.001$), 1h-Ghrelin ($p = 0.10$), 1h-GLP1 ($p = 0.06$), 1h-IL-6 ($p = 0.10$) and Leptin increment from 0-24h ($p = 0.006$) were associated with infarct volume. A multiple linear regression analysis adjusted for those variables with $p < 0.1$ on bivariate analysis, identified 1h-Ghrelin (B 46.25 [95% CI 2.34-90.16], $p = 0.03$), and Leptin increment (0h-24h) (OR 58.27 [95% CI 6.32-110.22], $p = 0.02$), as independently associated with a larger infarct volume.

Symptomatic hemorrhagic transformation

Two patients (3.8%) patients had a SHT. No significant relationship was found between molecule concentration and the probability of SHT.

Discussion

Among the 11 studied insulin resistance related-biomarkers, we found relevant associations between the plasma level of GIP, leptin, ghrelin, TNF- α and IL-6 and the outcome variables assessed in consecutive MCA ischemic stroke patients treated with i.v. tPA. Of note, a lower level of GIP measured at 1 and 24 hours after tPA bolus predicted a poorer long-term outcome. These results are in line with previous investigations suggesting that insulin resistance may play a deleterious role in acute ischemic stroke, mediated in part by hampering the therapeutic effect of intravenous thrombolysis.

Regarding the time profile of these molecules during the acute phase of ischemic stroke, we were not able to find previous studies in the literature with which to compare our results. When designing the study, we expected to find at least one molecule not suffering significant changes during the acute

phase, which could then serve as an indirect indicator of the patients' insulin resistance status prior to stroke. However, most of the studied biomarkers showed an increase in their plasma level during the first 24 hours after admission and could be therefore influenced by stroke-induced acute phase reaction. Interestingly, the associations with stroke outcome were not found for any of the biomarkers' pre-treatment level, but for the change in the molecule concentration observed during the first 24 hours after treatment onset. The magnitude of this acute change in the biomarkers concentration in response to cerebral ischemia showed a wide interindividual variability across the study sample. We suggest that the observed differences in the molecules' time profile might be influenced by pre-stroke insulin resistance status, although this hypothesis needs to be further clarified.

A higher level of GIP at 1 and 24 hours after tPA bolus was associated with a better long-term outcome after thrombolytic therapy. Moreover, a higher level of GIP at admission and at 24 hours was associated with early neurological recovery. GIP is widely recognized as a physiological incretin hormone, which potently stimulates insulin release depending on glucose level. Its secretion is regulated mainly by the presence of nutrients in the gastrointestinal tract [23], although the mechanisms regulating GIP release in the context of a stress reaction, such as the one triggered by ischemic stroke, are not well known. In animal models, sustained chemical knockout of GIP receptor signaling results in mild impairment of insulin secretion and glucose homeostasis [24]. Consistent with this view, human studies have reported markedly reduced levels of GIP in type 2 diabetic patients [25]. However, little is known about the role of this molecule in critically ill patients, and its potential contribution to the development of acute stress hyperglycemia [26]. In our series, we found that those patients with a less pronounced increase in GIP level during the first 24 hours, showed a higher glycemia at 24 hours. Hyperglycemia is known to be a strong determinant of poor outcome in stroke patients in general [27], and also in ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis [28]. In this context, not only admission's glycemia predicts stroke outcome, but hyperglycemia observed at any time within the first 48 hours may have a deleterious effect on stroke patients (5, 6). In order to explain the independent association found between GIP and outcome, we hypothesize that GIP expression in the setting of acute ischemic stroke might be a part of an insulin-sensitizing response aimed to reduce glucose level, thus counteracting the adverse effect of acute hyperglucemia on stroke outcome. More research is needed to know whether GIP is an active mediator or only an innocent bystander in acute ischemic stroke. If GIP turns to be actively involved in processes determining acute stroke outcome, whether its therapeutic modulation could bring any clinical effect would also deserve further study.

Both leptin and ghrelin were associated with final infarct volume. Leptin is an important adipose derived hormone

which regulates energetic intake and expenditure. The potential deleterious role of leptin in acute ischemic stroke, as suggested by our finding, is also supported by previous experimental studies. Leptin was shown to promote the expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in an *in vitro* culture of human vascular endothelial cells [29]. Moreover, leptin administration promoted arterial thrombosis *in vivo* studies in mice [30]. These prothrombotic effects may be inhibited after leptin neutralizing monoclonal antibody administration, as shown in murine models of arterial injury and pulmonary embolism [31]. In line with this experimental data, clinical studies in human found an association between higher leptin levels and endothelial dysfunction [32]. However, these studies, together with our results, are in disagreement with recent investigations performed in a mice model of transient focal cerebral ischemia showing that peripherally administered leptin decreased infarct volume by reducing oxidative stress and neuronal apoptosis [33]. Regarding ghrelin, our finding seems to be in conflict with what has been reported in the literature. Animal models of permanent focal cerebral ischemia in rats showed that ghrelin treatment results in decreased infarct size and neurological deficit through suppression of inflammation, nNOS activity, and apoptosis [34]. In both animal [35] and human [36] studies of cardiac disease, ghrelin improved left ventricular structure and function, exercise capacity and muscle wasting, suggesting that ghrelin could be a new therapeutic approach for the treatment of cardiac heart failure. The role of leptin and ghrelin in human cerebral ischemia needs to be further clarified.

A higher increase in IL-6 and TNF- α level during the first hour after thrombolytic treatment was associated with a worse early neurological course. Both IL-6 and TNF- α are known to be elevated in patients with insulin resistance [9], reflecting the existence of a proinflammatory state. This observation is consistent with previous studies showing an association between these and other inflammatory biomarkers determined during the first 24 hours after stroke onset and the probability of early neurological deterioration [37]. This proinflammatory state associated with insulin resistance [6], among other mechanisms, could contribute to worsen the response to intravenous thrombolysis and stroke outcome in general.

This study has some limitations. First, the final sample was small sized, although highly selected, and therefore our results need to be confirmed in a larger validation sample. Moreover, in the hyperacute stroke setting, the condition of insulin resistance is unknown for the majority of the patients. A larger sample would be also needed to separately evaluate the role of these and other biomarkers in stroke patients with a known history of insulin resistance, such as type 2 diabetics. Second, ultrasound protocol could not be fully accomplished in a significant number of patients, which precluded the selection of early arterial recanalization as a primary outcome variable. Third, other biomarkers associated with metabolic

syndrome and insulin resistance were not tested, such as adipokines, coagulation and fibrinolysis factors. Among adipokines, our biomarker panel did not include relevant molecules such as adiponectin. In agreement with our main hypothesis, linking insulin resistance with a poorer stroke outcome, both preclinical studies in rat [38] and mice [39] models of focal cerebral ischemia demonstrated a strikingly positive effect of adiponectin on cerebral flow and infarct size. Moreover, 5-year survival rate after first ever ischemic stroke was found to be higher in patients who had a lower adiponectin level determined within the first 24 hours after stroke onset [40]. Fourth, although arterial recanalization was assessed by TCCD, evaluation of brain reperfusion with neuroimaging would have been desirable.

Conclusions

In conclusion, our findings support the hypothesis that insulin resistance plays a deleterious role in acute ischemic stroke. A higher level of GIP at 1 and 24 hours after tPA bolus, probably reflecting a more intense insulin-sensitizing response, was associated with a better long-term outcome after thrombolytic therapy. Further studies are needed to elucidate the role of GIP and other insulin-resistance related biomarkers as new therapeutic targets in acute ischemic stroke. After this results, our future research plan may include, among other lines, to evaluate the role of GIP in an animal model of focal cerebral ischemia, and to study the role of insulin resistance in acute stroke patients treated with endovascular reperfusion therapies.

Competing interests

The authors' declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

A.I.C. contributed to the study design, patient selection, clinical work, neurosonology, data collection, analysis and interpretation, and writing of the manuscript. E.C. and P.G.-B. contributed to patient selection, clinical work, neurosonology, and data collection. J.R. contributed to blood sampling and laboratory work. J.F.B. contributed to laboratory work and analysis. M.F.M. contributed to analysis. R.F.-H. contributed comments to the manuscript. J.F.A. contributed to the study design, patient selection, clinical work, neurosonology, data collection, analysis and interpretation, and writing of the manuscript.

Acknowledgements and funding

The authors thank Rosa Alcaide and Edita Sánchez on behalf of the nursing staff of the Stroke Unit, without whom completion of this study would have never been possible. A.I.C. was the recipient of a research grant from Instituto de Salud Carlos III (Río Hortega program), Ministry of Science, Spain (2008-2011), which was cofounded between Instituto de Salud Carlos III and Hospital Clínico Universitario, Salud Castilla y León (SACYL); Department of Health, Castilla y León (SACYL); Gerencia Regional de Salud, Castilla y León (SACYL).

Publication history

Received: 19-Nov-2012 Revised: 29-Dec-2012 Accepted: 3-Jan-2013 Published:

References

1. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995, 333:1581-7. | [Article](#)
2. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghini Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D: Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008, 359:1317-1329. | [Article](#) | [PubMed](#)
3. Arenillas JF, Ispuerto L, Millan M, Escudero D, Perez de la Ossa N, Dorado L, Guerrero C, Serena J, Castillo J, Davalos A: Metabolic syndrome and resistance to IV thrombolysis in middle cerebral artery ischemic stroke. *Neurology* 2008, 71:190-195. | [Article](#) | [PubMed](#)
4. Arenillas JF, Sandoval P, Perez de la Ossa N, Millan M, Guerrero C, Escudero D, Dorado L, Lopez-Cancio E, Castillo J, Davalos A: The metabolic syndrome is associated with a higher resistance to intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in women than in men. *Stroke* 2009, 40:344-349. | [Article](#) | [PubMed](#)
5. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M: The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005, 28:2289-2304. | [Article](#) | [PubMed](#)
6. Calleja AI, Garcia-Bermejo P, Cortijo E, Bustamante R, Rojo Martinez E, Gonzalez Sarmiento E, Fernandez-Herranz R, Arenillas JF: Insulin resistance is associated with a poor response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. *Diabetes Care* 2011, 34:2413-2417. | [Article](#) | [PubMed](#)
7. Natarajan S, Siddiqui A, Chaudhuri A, Dandona P: Comment on: Calleja et al. insulin resistance is associated with a poor response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. *Diabetes Care* 2011;34:2413-2417. *Diabetes Care* 2012, 35:e49; author reply e50. | [Article](#) | [PubMed](#)
8. Fuentes B, Castillo J, San Jose B, Leira R, Serena J, Vivancos J, Davalos A, Nunez AG, Egidio J, Diez-Tejedor E: The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: the Glycemia in Acute Stroke (GLIAS) study. *Stroke* 2009, 40:562-568. | [Article](#) | [PubMed](#)
9. Gnancinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K: Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 2009, 54:150-157. | [Article](#) | [PubMed](#)
10. Schafer K, Konstantinides S: Adipokines and thrombolysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011, 38:864-871. | [Article](#) | [PubMed](#)
11. Luc G, Empana JP, Morange P, Juhan-Vague I, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Kee F, Bingham A, Machez E, Ducimetiere P: Adipocytokines and the risk of coronary heart disease in healthy middle aged men: the PRIME Study. *Int J Obes (Lond)* 2010, 34:118-126. | [Article](#) | [PubMed](#)
12. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Chernova J, Lawlor DA, Kelly A, Wallace AM, Danesh J, Whincup PH: Leptin and coronary heart disease: prospective study and systematic review. *J Am Coll Cardiol* 2009, 53:167-175. | [Article](#) | [PubMed](#)
13. Prugger C, Luc G, Haas B, Arveiler D, Machez E, Ferrieres J, Ruidavets JB, Bingham A, Montaye M, Amouyel P, Yarnell J, Kee F, Ducimetiere P, Empana JP: Adipocytokines and the risk of ischemic stroke: the PRIME Study. *Ann Neurol* 2012, 71:478-486. | [Article](#) | [PubMed](#)
14. Matsumoto M, Ishikawa S, Kajii E: Association of adiponectin with cerebrovascular disease: a nested case-control study. *Stroke* 2008, 39:323-328. | [Article](#) | [PubMed](#)
15. Weikert C, Westphal S, Berger K, Dierkes J, Mohlig M, Spranger J, Rimm EB, Willich SN, Boeing H, Pischon T: Plasma resistin levels and risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93:2647-2653. | [Article](#) | [PubMed](#)
16. Wahlgren N, Ahmed N, Eriksson N, Aichner F, Bluhmki E, Davalos A, Erita T, Ford GA, Grond M, Hacke W, Hennerici MG, Kaste M, Kohrmann M, Larrue V, Lees KR, Machnig T, Roine RO, Toni D, Vanhooren G: Multivariable analysis of outcome predictors and adjustment of main outcome results to baseline data profile in randomized controlled trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring Study (SITS-MOST). *Stroke* 2008, 39:3316-3322. | [Article](#) | [PubMed](#)
17. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, et al.: Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989, 20:864-870. | [Article](#) | [PubMed](#)
18. 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. | [Article](#) | [PubMed](#)
19. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W, Hennerici MG, Kaste M, Kuelkens S, Larrue V, Lees KR, Roine RO, Soenne L, Toni D, Vanhooren G: Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007, 369:275-282. | [Article](#) | [PubMed](#)
20. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd: 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. | [Article](#) | [PubMed](#)
21. 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. | [Article](#) | [PubMed](#)
22. Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD, Alexandrov AV: Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2001, 32:89-93. | [Article](#) | [PubMed](#)
23. Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, Schmidt WE, Gallwitz B: Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes* 2004, 53:654-662. | [Article](#) | [PubMed](#)
24. Irwin N, Gault VA, Green BD, Greer B, McCluskey JT, Harriott P, O'Harte FP, Flatt PR: Effects of short-term chemical ablation of the GIP receptor on insulin secretion, islet morphology and glucose homeostasis in mice. *Biol Chem* 2004, 385:845-852. | [Article](#) | [PubMed](#)
25. Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF: The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 297:127-136. | [Article](#) | [PubMed](#)
26. Llompert-Pou JA, Fernandez-de-Castillo AG, Burguera B, Perez-Barcelona J, Marse P, Rodriguez-Yago M, Barcelo A, Raurich JM: Stress hyperglycaemia in critically ill patients: potential role of incretin hormones; a preliminary study. *Nutr Hosp* 2012, 27:130-137. | [Article](#) | [PubMed](#)
27. Allport L, Baird T, Butcher K, Macgregor L, Prosser J, Colman P, Davis S: Frequency and temporal profile of poststroke hyperglycemia using continuous glucose monitoring. *Diabetes Care* 2006, 29:1839-1844. | [Article](#) | [PubMed](#)
28. Alvarez-Sabin J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M: Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator-treated patients. *Stroke* 2003, 34:1235-1241. | [Article](#) | [PubMed](#)
29. Singh P, Peterson TE, Barber KR, Kuniyoshi FS, Jensen A, Hoffmann M, Shamsuzzaman AS, Somers VK: Leptin upregulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 392:47-52. | [Article](#) | [PubMed](#) | [Abstract](#) | [PubMed Full Text](#)
30. Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT: Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:e119-122. | [Article](#) | [PubMed](#)
31. Konstantinides S, Schafer K, Neels JG, Dellas C, Loskutoff DJ: Inhibition of endogenous leptin protects mice from arterial and venous thrombosis.

Calleja et al. *Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism* 2013, <http://www.hoajonline.com/journals/jdrcm/content/pdf/volume/2/1.pdf>

9

- Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, **24**:2196-2201. | [Article](#) | [PubMed](#)
32. Leung YM, Kwan CY: Dual vascular effects of leptin via endothelium: hypothesis and perspective. *Chin J Physiol* 2008, **51**:1-6. | [PDF](#) | [PubMed](#)
33. Zhang JY, Jr., Si YL, Liao J, Yan GT, Deng ZH, Xue H, Wang LH, Zhang K: Leptin administration alleviates ischemic brain injury in mice by reducing oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis. *J Trauma Acute Care Surg* 2012, **72**:982-991. | [Article](#) | [PubMed](#)
34. Cheyuo C, Wu R, Zhou M, Jacob A, Coppa G, Wang P: Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. *Shock* 2011, **35**:258-265. | [Article](#) | [PubMed](#)
35. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K: Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001, **104**:1430-1435. | [Article](#) | [PubMed](#)
36. Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K: Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2004, **110**:3674-3679. | [Article](#) | [PubMed](#)
37. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A: Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000, **31**:2325-2329. | [Article](#) | [PubMed](#)
38. Chen B, Liao WQ, Xu N, Xu H, Wen JY, Yu CA, Liu XY, Li CL, Zhao SM, Campbell W: Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action. *Brain Res* 2009, **1273**:129-137. | [Article](#) | [PubMed](#)
39. Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA, Ouchi N: Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation* 2008, **117**:216-223. | [Article](#) | [PubMed](#)
40. Efstathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, Gratsias YE, Pefanis AV, Mountokalakis TD: Plasma adiponectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. *Stroke* 2005, **36**:1915-1919. | [Article](#) | [PubMed](#)