



Universidad de Valladolid



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE
VEGFA, VEGFR2, ENDOTELINA,
ENDOGLINA Y eNOS EN LA
HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA
ESPONTÁNEA Y SU RELACIÓN CON LOS
ANEURISMAS CEREBRALES**

Presentada por Paloma Jiménez Arribas
para optar al grado de
Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Carlos Alberto Rodríguez Arias

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de una u otra forma a hacer posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, al Doctor Carlos A. Rodríguez Arias, Director de esta tesis, por su apoyo, insistencia, guía y sabios consejos en estos años, sin los cuales no habría finalizado este trabajo.

A los Doctores Rogelio González Sarmiento y Ricardo Usategui Martín, del departamento de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca, por su enorme colaboración con la parte experimental del trabajo, enseñarme las técnicas de laboratorio necesarias para la realización de este estudio y ayudarme a interpretar los estudios genéticos.

A todo el personal del Laboratorio de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca por el sobreesfuerzo de tantas muestras procesadas.

A M^a Fe Muñoz Moreno y David Sandonís Camarero, por su inestimable ayuda y sus indicaciones en el análisis estadístico.

A los pacientes y personas sanas que se prestaron voluntarios para la realización del estudio.

A mi familia, en especial a mis padres, que son mi apoyo incondicional.

A José María (DEP), el primero que supo ver en mí mis posibilidades y confió plenamente en que lo lograría.

Por último, para Álvaro mi mayor agradecimiento y dedicatoria especial. Él ha compartido conmigo esta travesía. Me ha ayudado a no desanimarme en aquellos momentos difíciles y ha sabido entenderme con paciencia en tantas horas de dedicación.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- AI:** aneurismas intracraneales.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- CONSCIOUS:** *Clazosentan to Overcome Neurological iSChemia and Infarct OccUrring after Subarachnoid hemorrhage.*
- COX:** ciclooxigenasa.
- DM:** diabetes mellitus.
- DVE:** drenaje ventricular externo.
- DVP:** derivación ventrículo-peritoneal.
- EGF:** factor de crecimiento endotelial.
- eNOS:** enzima óxido nítrico sintasa endotelial.
- ET:** Endotelina.
- FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos.
- GOSE:** *Glasgow Outcome Scale extended.*
- GWAs:** estudios de genotipado masivo o “*Genome Wide Association studies*”.
- HHT1:** Telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 1.
- HTA:** hipertensión arterial.
- HSA:** hemorragia subaracnoidea.
- HSAa:** Hemorragia subaracnoidea aneurismática.
- ICD:** isquemia cerebral diferida.
- IFN- γ :** interferón gamma.
- ISAT:** *International Subarachnoid Aneurysm Trial.*
- ISUIA:** *International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms.*
- LCR:** líquido cefalorraquídeo.
- MMP:** metaloproteinasas.
- NO:** óxido nítrico.
- OR:** *Odds ratio.*
- PAM:** presión arterial media.
- PAS:** presión arterial sistólica.
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- PHASES:** *Population, Hypertension, Age, Size, Earlier subarachnoid hemorrhage, Site.*
- PIC:** presión intracraneal.
- PICA:** Arteria cerebelosa postero-inferior.
- PIGF:** factor de crecimiento placentario.
- qQRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- SAHIT:** *Subarachnoid Haemorrhage International Trialists.*
- SNP:** Single Nucleotide *Polymorphism* o Polimorfismo de un solo nucleótido.
- TC:** tomografía computarizada.
- TGF- α :** factor de crecimiento transformante alfa.
- TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta.
- UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.
- VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular.
- VEGFR:** receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.
- WFNS:** *World Federation of Neurosurgical Societies/Federación Mundial de Sociedades Neuroquirúrgicas.*
- WSS:** *Wall shear stress* o estrés de cizallamiento.

INTRODUCCIÓN	1
LA HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA ANEURISMÁTICA	1
1. DEFINICIÓN	1
2. HISTORIA.....	1
3. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
3.1. Región geográfica y etnia.....	4
3.2. Edad.....	5
3.3. Género.....	5
4. FISIOPATOLOGÍA E HISTORIA NATURAL.....	6
4.1. Resangrado.....	6
4.2. Hidrocefalia.....	7
4.3. Vasoespasmo e isquemia cerebral diferida	8
5. PRESENTACIÓN CLÍNICA	10
6. DIAGNÓSTICO	11
7. TRATAMIENTO	13
7.1. Tratamiento médico.....	13
7.2. Tratamiento específico del aneurisma cerebral.....	15
8. PRONÓSTICO.....	18
LOS ANEURISMAS INTRACRANEALES	19
1. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ANEURISMAS INTRACRANEALES.....	20
2. TIPOS DE ANEURISMAS INTRACRANEALES.....	21
3. FACTORES DE RIESGO PARA LA RUPTURA DE UN ANEURISMA INTRACRANEAL.....	23
3.1. Demográficos	23
3.2. Biofísicos.....	24
4. MECANISMO DE FORMACIÓN DE UN ANEURISMA INTRACRANEAL.....	25
4.1. Aspectos genéticos	25
4.2. Factores histológicos, citológicos y moleculares	26
4.3. Proceso inflamatorio.....	29

4.4. Alteraciones biomecánicas.....	30
VULNERABILIDAD GENÉTICA FRENTE A LOS ANEURISMAS INTRACRANEALES.....	34
1. Alteraciones monogénicas.....	34
2. Polimorfismos.....	34
Polimorfismos del gen VEGF.....	36
Polimorfismos del gen ENDOTELINA-1	37
Polimorfismos del gen ENDOGLINA.....	38
Polimorfismos del gen eNOS	39
HIPÓTESIS.....	42
OBJETIVOS	44
MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
PACIENTES.....	46
MÉTODOS.....	47
Selección de los polimorfismos	47
Protocolo de extracción del ADN.....	48
Genotipado de los polimorfismos.....	49
Análisis estadístico.....	52
RESULTADOS.....	54
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	55
ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS	58
1. Hidrocefalia	58
2. Vasoespasmo	59
ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS.....	60
Polimorfismo rs833061 del gen VEGFA.....	61
Polimorfismo rs2071559 del gen VEGFR2.....	62
Polimorfismo rs5370 del gen ENDOTELINA-1.....	63
Polimorfismo rs3739817 del gen ENDOGLINA.....	64
Polimorfismo rs1799983 del gen eNOS.....	65

DISCUSIÓN	69
1. ASPECTOS GENERALES.....	70
2. LOS ANEURISMAS COMO PROBLEMA SOCIOSANITARIO	70
3. ESTUDIO CLÍNICO. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES NO GENÉTICAS Y SU INFLUENCIA EN LA EVOLUCIÓN DE LA HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA.....	72
3.1. Hidrocefalia.....	72
3.2. Vasoespasmo.....	73
4. ESTUDIO GENÉTICO	74
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA.....	74
4.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS	77
Polimorfismos del gen VEGF	78
Polimorfismos del gen ENDOTELINA-1	80
Polimorfismos del gen ENDOGLINA	82
Polimorfismos del gen de eNOS	85
5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	88
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO	107
I.....	108
II.....	112
III.....	116
IV.....	120
V	124

INTRODUCCIÓN

LA HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA ANEURISMÁTICA

1. DEFINICIÓN

La hemorragia subaracnoidea (HSA) es una extravasación repentina de sangre en el espacio subaracnoideo, comprendido entre piamadre y aracnoides, que corresponden a las capas interna y media respectivamente de las meninges que recubren el encéfalo.

Se clasifica en traumática y espontánea. La HSA traumática, es decir, secundaria a un traumatismo craneoencefálico, es la más frecuente. Sin embargo, la espontánea es la que está íntimamente relacionada con la ruptura de un aneurisma cerebral. Aunque existen otras causas de HSA espontánea, como las malformaciones vasculares, tumores cerebrales, alteraciones de la pared vascular y alteraciones de la coagulación, la hemorragia subaracnoidea espontánea de origen aneurismático (HSAa) supone cerca del 80% de los casos ⁴⁹.

La HSAa supone del 6 al 8% de todas las enfermedades vasculares cerebrales agudas, aunque su importancia radica en que afecta a pacientes más jóvenes que el ictus isquémico y tiene una elevada morbi-mortalidad ⁶⁹. Se manifiesta con cefalea intensa, náuseas, vómitos, déficit neurológico focalizado y pérdida de la consciencia, entre otros ⁴². En todos los casos, se trata de una emergencia sanitaria y necesita atención médica inmediata.

2. HISTORIA

En cuanto a las referencias históricas de la HSAa y los aneurismas cerebrales, han sido múltiples a lo largo de los tiempos. Sin embargo, en las primeras de las que disponemos, no se relacionan estos dos procesos como una misma enfermedad. El motivo seguramente sea debido a que en esos tiempos primaban las supersticiones religiosas y se carecía del examen corporal externo o autopsia.

La primera referencia de un aneurisma cerebral data del año 2725 a. C. Corresponde a Imhotep, el fundador de la antigua medicina egipcia, que dejó reflejado en el Papiro de Ebers lo siguiente: “*Se trata de una inflamación de los vasos, un trastorno*”

*que trataré. Tiene su origen en una lesión sobre el vaso. Entonces le aplicarás el tratamiento con un cuchillo que calentarás al fuego y el sangrado no será considerable”*⁹⁷.

Para encontrar la primera alusión reflejada en un manuscrito sobre la HSAa tenemos que remontarnos a la Biblia. En el segundo Libro de los Reyes, capítulo 4, versículos 18-37, se recoge la historia de un joven de 16 años que, mientras realiza las labores de siega en compañía de su padre, desarrolla una cefalea grave y repentina, seguida de un deterioro progresivo de la consciencia, con el resultado de que termina por dársele por fallecido. El texto lo refleja de la siguiente manera: *“Y el niño creció. Pero un día que fue a ver a su padre, que andaba con los segadores, de pronto gritó: «¡Padre, mi cabeza! ¡Me duele la cabeza!» Enseguida el padre ordenó a uno de sus criados que lo llevara con su madre. El criado así lo hizo. Pero al mediodía, mientras el niño estaba sentado en el regazo de su madre, murió”*¹¹⁸.

Más adelante, en torno al 440 a. C., fue Hipócrates quien se refirió a la HSAa en su obra Aforismos sobre la apoplejía⁵⁵: *“Cuando personas que gozan de buena salud son aprehendidas súbitamente con dolores en la cabeza, y en seguida se acuestan sin palabras, y respiran con estertor, mueren en siete días, a menos que aparezca fiebre”*.

Sin embargo, no fue hasta más de 3 siglos después cuando se registraron los primeros mecanismos fisiopatológicos de los aneurismas. El médico efesio Flaenius Rufus (117 a. C.), que se formó en Alexandria, sugirió que la dilatación arterial podía ocurrir tras un traumatismo. Varios cientos de años después, el médico griego Galeno de Pérgamo (129-210 d.C.) acuñó el término aneurisma, del griego *aneurysma*, que significa ensanchamiento; de *anu*, a través y *eurys*, amplio⁹³.

A lo largo de la Edad Media, el conocimiento y tratamiento de los aneurismas de las arterias periféricas avanzó considerablemente; sin embargo, el descubrimiento y demostración de los aneurismas intracraneales y su relación fisiopatológica con la HSAa, siguió siendo un misterio hasta el siglo XIX. Morgagni de Padua (1682-1771 d.C.), médico italiano y padre de la anatomía patológica moderna gracias a sus detalladas descripciones necróscopicas, fue el primero en describir por primera vez un aneurisma cerebral en una autopsia⁹⁶. Tal fue su influencia en el desarrollo del conocimiento de múltiples patologías que hoy en día la mesa en que se realizan las autopsias se conoce como "mesa de Morgagni".

Posteriormente fue John Blackall (1771-1860 d.C.) quien estableció el vínculo entre la ruptura de un aneurisma y las características clínicas del síndrome de hemorragia subaracnoidea. Blackall describió las características anatómicas de una arteria basilar rota y la relacionó con la repentina muerte del príncipe heredero sueco Carlos Augusto, un acontecimiento lo que dio lugar a una nueva dinastía real que existe hasta el día de hoy⁹³. Samuel Wilks, un médico británico, fue el primero en acuñar el término hemorragia subaracnoidea espontánea en 1859 y asociarlo a signos clínicos tales como la cefalea pulsátil, la parálisis del tercer par craneal o un soplo en la auscultación¹¹⁴.

Los primeros pasos en la cirugía para un aneurisma intracraneal datan de 1855, cuando Victor Horsley, un médico inglés, encontraría de manera incidental un aneurisma gigante mientras intervenía a un paciente de lo que creía era un tumor cerebral. Horsley ligó con éxito la arteria carótida interna cervical y el paciente sobrevivió, por lo que, a partir de entonces, propuso la ligadura proximal de la arteria carótida interna como tratamiento para los aneurismas cerebrales con el objetivo de disminuir el flujo sanguíneo en el saco aneurismático⁹³. Esta técnica fue pronto cuestionada por compañeros como el doctor Harvey Cushing (1869-1939 d. C.), considerado unos de los padres de la Neurocirugía Contemporánea, que siempre tuvo sus reservas sobre este procedimiento por la alta tasa de hemiparesia postoperatoria. Cushing fue el primero en realizar craneotomías exploradoras, disecar los aneurismas y protegerlos de la rotura cubiéndolos con músculo para reforzar su pared²⁰. Por otro lado, Selverstone, neurocirujano americano, propuso en 1951 el cierre progresivo de la arteria carótida interna cervical mediante una abrazadera que se cerraba progresivamente en el transcurso de 72 horas. Esta técnica promovía la trombosis dentro del saco aneurismático mientras permitía activar el funcionamiento de la circulación colateral, reduciendo notablemente las complicaciones. Además, ofrecía la posibilidad de revertir el procedimiento en caso de intolerancia a la reducción del flujo¹²⁰.

Con el descubrimiento de la angiografía por Egas Moniz en 1927, comienza el período de los abordajes directos a los sacos aneurismáticos por los neurocirujanos de la época. Así, en 1937, el neurocirujano americano Walter Dandy (1886-1946 d. C.) realizó con éxito el primer clipaje de un aneurisma intracraneal²². Este procedimiento marcó el nacimiento de la neurocirugía vascular moderna, cuyos principios básicos siguen en práctica hoy en día.

3. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia anual de HSAa es de 6 a 33 casos/100,000 habitantes. La variabilidad tan amplia en este intervalo depende de la región geográfica, el género y la franja de edad principalmente ²⁵.

La mayoría de los aneurismas intracraneales (AI) no se romperán nunca ni producirán ningún síntoma. El riesgo de ruptura y, por lo tanto, la incidencia de HSAa depende por ejemplo de la región geográfica. La prevalencia de aneurismas, sin embargo, no es diferente en las distintas regiones geográficas. Si la incidencia de la hemorragia subaracnoidea en Europa (excepto Finlandia) y Norteamérica es aproximadamente 10 casos por cada 100.000 habitantes y año, esto significa que únicamente 1 de cada 200-300 aneurismas se rompe cada año. En una revisión de 2011 del Grupo de Patología Vasculare de la Sociedad Española de Neurocirugía ⁷⁶, se estimó la incidencia de HSAa en nuestro país en 6.1 casos por 100.000 habitantes-año.

La HSAa constituye más del 25% de los accidentes cerebrovasculares en menores de 65 años ¹⁵³. Su tasa de mortalidad es del 40% y de los pacientes que sobreviven, muchos presentan secuelas neurológicas a largo plazo. Se calcula que apenas un 50% puede volver a tener una vida independiente y que un 30% de los supervivientes queda con una discapacidad moderada-grave ⁴⁹.

3.1 Región geográfica y etnia

En una revisión sistemática de 2007 que incluyó 51 estudios de 21 países, y un total de 45.821.896 personas-año ²⁵, calcularon una incidencia de HSAa de 9.1 (casos por cada 100.000 personas-año) para la población no japonesa, no finlandesa, y no latinoamericana. En Japón y Finlandia la incidencia es algo más del doble, 22.7 y 19.7 respectivamente. En Sudamérica y Centroamérica la incidencia es aproximadamente la mitad de la observada en Europa y Norteamérica. En esta revisión se calculó una incidencia de 4.2 para esta región. En otro estudio epidemiológico realizado por la Organización Mundial de la Salud ⁵⁹, se recogió prospectivamente la incidencia de HSAa en diferentes poblaciones europeas y en Pekín (China). En la cohorte china, la incidencia fue de solo 2.0 (casos por 100.000 personas-año); mientras que la máxima incidencia se reportó en Finlandia siendo de 22.5. Otros trabajos han reportado una incidencia en la India entre 3 y 4 casos por cada 100.000 personas-año ⁷⁴.

Estas diferencias entre países se mantienen a pesar de ajustar por la edad. Puesto que la HSAa aumenta con la edad, podría pensarse que la incidencia es alta en Japón por ser el país con mayor edad media y mayor esperanza de vida, y por el contrario ser menor en Latinoamérica por presentar una edad media inferior a Europa o Norteamérica. Sin embargo, la edad no explica estas diferencias en la incidencia cuando se ajusta por la misma.

Las diferencias tampoco se explican por una mayor presencia de aneurismas en la población japonesa o finlandesa. La prevalencia de aneurismas no rotos en dichas poblaciones es similar a la población europea o norteamericana, como ha puesto de manifiesto una revisión sistemática en 2011 ¹³⁹.

Aunque la explicación de estas diferencias no está hoy en día totalmente aclarada, se piensa que tenga relación con diferencias raciales de naturaleza genética y la distinta prevalencia de factores de riesgo en ellas (por ejemplo, la hipertensión) y no tanto con factores de riesgo ambientales ⁸².

3.2 Edad

La edad de presentación más frecuente en la HSAa es alrededor de los 55 años, aumentando la incidencia al aumentar la edad ^{25, 133}. Existe un aumento progresivo década a década; incluso por cada año de aumento calcularon un aumento del riesgo en 1.06 (IC95% de 1.05 a 1.07).

3.3 Género

A diferencia de otros tipos de ictus, la HSAa ocurre con mayor frecuencia en las mujeres, siendo la incidencia 1.24 veces mayor que en los hombres ²⁵. Es interesante resaltar que el aumento de incidencia en mujeres ocurre sobretodo pasados los 55 años, punto en que las curvas de incidencia según el género se separan.

Una explicación posible a estos datos es el cambio en el nivel de estrógenos que sucede con la llegada de la menopausia. Entre las funciones de los estrógenos, destaca la de proteger la pared arterial inhibiendo algunos de los procesos inflamatorios que producen su degeneración y que podrían colaborar en la formación de aneurismas. En la menopausia, los niveles de estrógenos disminuyen y el estrés oxidativo de la pared arterial aumenta. Además, este cambio hormonal suele estar asociado al desarrollo de hipertensión arterial, lo que se sumaría al proceso de daño de la pared vascular ³⁹.

4. FISIOPATOLOGÍA E HISTORIA NATURAL

La HSAa es una enfermedad tremendamente agresiva. Provoca la muerte o la morbilidad permanente en aproximadamente el 50% de los pacientes. Uno de cada 8 pacientes fallece antes de llegar al hospital ¹³⁴ y entre el 25% y el 60% fallece durante el primer mes dependiendo de las series ⁶¹.

La fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea está dividida en una serie de fases, cada una de ellas compuesta por una serie de procesos.

- Fase inicial o de “daño cerebral temprano o agudo”. Comienza inmediatamente tras el sangrado y dura aproximadamente 72 horas. Engloba 3 factores ¹⁴:
 - El aumento inmediato de la presión intracraneal (PIC).
 - La disminución del flujo sanguíneo cerebral, lo que conlleva la pérdida de autorregulación, la reducción de la presión de perfusión cerebral y la isquemia cerebral global.
 - El inicio de una cascada inflamatoria debida a la hipoxia cerebral con liberación de citoquinas proinflamatorias que inician una cascada de eventos y que pueden acabar en muerte celular, provocando edema citotóxico.

Esta fase se convierte en una reacción en cadena de consecuencias catastróficas, que incluye: elevación de la PIC, disminución del flujo sanguíneo cerebral, disfunción de la barrera hematoencefálica, edema cerebral, vasoespasmos agudos microvasculares, excitotoxicidad, despolarización cortical progresiva, inflamación tisular, aumento del estrés oxidativo, desequilibrio electrolítico, activación de la vía del óxido nítrico y liberación de metaloproteinasas.

- Fase secundaria: resangrado, hidrocefalia, vasoespasmos e isquemia cerebral diferida (ICD). El resangrado y la hidrocefalia pueden ocurrir en ambas fases.

4.1. Resangrado.

Se entiende por resangrado la segunda hemorragia producida por el mismo aneurisma que produjo la primera. Se define como un evento intrahospitalario cuando el paciente ya ha sido diagnosticado de hemorragia subaracnoidea. Ocurre en el 8- 23% de los pacientes en las primeras 72 horas.

El riesgo de resangrado disminuye a medida que aumenta el tiempo respecto al sangrado inicial, siendo máximo en las primeras 6 horas, que es cuando ocurren entre el 50-90% de los resangrados. Este evento implica una gran mortalidad, entre el 20% y el 60% (mayor que el sangrado inicial). Si el aneurisma del paciente no se trata, aproximadamente el 30% sufrirá un resangrado en el primer mes⁷⁸. Entre los factores de riesgo predisponentes al resangrado se han descrito: el volumen de sangrado (grados 3 o 4 en la escala modificada de Fisher, desarrollada más adelante en el apartado 4), la inserción de un drenaje ventricular externo (DVE) antes de la obliteración del aneurisma y la irregularidad morfológica del aneurisma⁷¹.

Respecto a la prevención del resangrado, el mejor tratamiento preventivo es la exclusión del AI de la circulación tan pronto como sea logísticamente posible. Las últimas guías europeas de manejo de la HSAa no reconocen ningún tratamiento médico efectivo que reduzca el resangrado (antifibrinolíticos, transfusiones de plaquetas o desmopresina) y mejore el pronóstico (recomendación clase I)¹²⁵.

4.2. Hidrocefalia.

Es importante su diferenciación temporal. Se considera hidrocefalia aguda la que ocurre en los primeros 3 días, subaguda entre los días 4 y 14 y crónica a partir de la tercera semana. La incidencia de hidrocefalia es tremendamente dispar entre las series, precisamente por la no diferenciación entre hidrocefalia aguda y crónica en muchas de ellas. Esta proporción oscila entre el 15% y el 58% en la fase aguda, y entre el 4% y el 37% en la fase crónica¹⁴⁷.

La hidrocefalia aguda cuando va acompañada de deterioro del nivel de consciencia se trata con la colocación de un DVE. El tratamiento más utilizado para la hidrocefalia crónica posthemorrágica es la derivación ventrículo-peritoneal (DVP).

La etiología de la hidrocefalia en la fase aguda no está clara. En el momento del sangrado inicial se produce un aumento brusco de la PIC. Este aumento de PIC por el coágulo de sangre en los espacios subaracnoideos produce un efecto de masa sobre el acueducto de Silvio, que produce una hidrocefalia triventricular de naturaleza obstructiva¹⁴⁷. También podría producirse de una manera más directa, a través de la obstrucción mecánica a la circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR) por coágulos intraventriculares.

En cuanto a la hidrocefalia crónica posthemorrágica, su naturaleza es comunicante o arreabsortiva. Se debe a los productos de degradación hemática, que producen inflamación y fibrosis en los cauces normales de absorción y drenaje del LCR, impidiendo o reduciendo su funcionamiento¹⁴⁷. Por este motivo a mayor cantidad de sangrado inicial, mayor riesgo de desarrollo de hidrocefalia crónica y necesidad de DVP.

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de hidrocefalia crónica post-HSAa, y la necesidad de DVP se encuentran: el grado en la escala Fisher 3-4, la edad superior a 50-60 años, la presencia de hidrocefalia aguda, el resangrado, la presencia de sangre intraventricular, un peor grado clínico al ingreso, la aparición de complicaciones como meningitis o neumonía, los aneurismas de circulación posterior como causa de sangrado y el tratamiento mediante embolización^{24, 145, 147}. Como explicación a este último factor, se propone que el lavado directo de la hemorragia en las cisternas durante la microcirugía y la eliminación de parte de los productos de degradación hemática sea responsable de este efecto.

4.3 Vasoespasmo e isquemia cerebral diferida.

El vasoespasmo cerebral consiste en un estrechamiento prolongado pero reversible de las arterias cerebrales, que comienza días después de la HSAa. El periodo de vasoespasmo comienza generalmente después del tercer día tras la ruptura aneurismática, tiene su pico de incidencia entre los días 6 y 8, y dura 2-3 semanas⁸³.

Con el término “vasoespasmo radiológico” nos referimos a los casos en los que se demuestra espasmo arterial mediante pruebas radiológicas, como la AngioTC, el Eco-doppler transcraneal o la angiografía cerebral. Está presente en >90% de los pacientes⁵⁸, es más frecuente en el territorio de la arteria cerebral anterior, seguido del territorio de la arteria cerebral media y con frecuencia afecta a 2-3 grandes vasos o es bilateral²⁸.

Sin embargo, no todos los pacientes que presentan vasoespasmo en las pruebas de imagen manifiestan síntomas. Por ello hablamos de “vasoespasmo clínico” en aquellos casos en los que identificamos signos y síntomas, y que en ocasiones definimos como isquemia cerebral diferida³⁶. La ICD ocurre en el 26% de los pacientes con HSAa y se define como la aparición de un déficit neurológico focal nuevo (por ejemplo, hemiparesia, afasia, o apraxia) o un deterioro del nivel de conciencia (déficit no focal) de al menos dos puntos en la escala de coma de Glasgow y que se mantiene durante al menos una hora¹³⁵.

El factor predictor más importante de la aparición de vasoespasmo es la gravedad de la hemorragia en la TC craneal, seguido del tabaquismo y la hipertensión arterial. Otros como la situación neurológica inicial, resangrado, la presencia de hidrocefalia aguda, hemorragia intraventricular o intracerebral muestran una tendencia al vasoespasmo mayor pero no estadísticamente significativa ^{28, 58}. Otros estudios posteriores apuntan que la glucemia elevada ¹¹² y una menor edad aumentan la frecuencia de vasoespasmo radiológico, sin embargo, no hay mayor frecuencia de ICD ⁸⁹.

Fisiopatología del vasoespasmo

Debe diferenciarse el vasoespasmo de grandes arterias cerebrales proximales o extraparenquimatosas con el espasmo de la microcirculación (arterias intraparenquimatosas y arteriolas). El espasmo arterial proximal, que puede identificarse por ejemplo mediante la angiografía proximal, no siempre se traduce en vasoespasmo en la microcirculación. La “teoría del control dual de Harper” sostiene que frente a un espasmo arterial proximal se produce una vasodilatación distal compensadora como mecanismo de la autorregulación cerebral. En el ámbito experimental, el vasoespasmo inducido en grandes arterias no reduce el flujo sanguíneo cerebral distal a menos que se añada un daño o insulto adicional, como una caída en la presión arterial sistémica. Por tanto, los mecanismos compensadores son capaces de soportar un primer insulto que produzca el vasoespasmo, pero pueden ser superados por segundos insultos que produzcan una caída del flujo sanguíneo cerebral a niveles suficientes para producir isquemia ¹².

Los mecanismos fisiopatológicos que producen el estrechamiento arterial son diversos ^{30, 51, 86}:

- a) Disminución de la producción de óxido nítrico (NO), sustancia vasodilatadora y antitrombótica, por las células endoteliales y los nervios perivasculares y disminución de la capacidad de las células musculares lisas a responder al mismo.
- b) Aumento de la síntesis de endotelina-1 (sustancia vasoconstrictora) o aumento de la sensibilidad de las arterias a esta sustancia.
- c) Aumento del estrés oxidativo producido por la degradación del hierro y el grupo hemo de la hemoglobina.
- d) Disfunción de la barrera hemato-encefálica por apoptosis de células endoteliales o debido a la liberación de trombina.

- e) Excitotoxicidad que favorece la contracción mantenida de la musculatura lisa de los vasos, con mayor sensibilidad al calcio, disminución del número de canales de potasio, y supersensibilidad a aminas adrenérgicas (noradrenalina, serotonina).
- f) Remodelado de la musculatura lisa vascular.
- g) Estado protrombótico con aumento de la agregación plaquetaria, formación de trombos y liberación de microémbolos.
- h) Activación de cascadas inflamatorias.
- i) Ondas de despolarización cortical progresiva que producen espasmo en la microcirculación.

5. PRESENTACIÓN CLÍNICA

El síntoma característico de la ruptura de un aneurisma intracraneal es una cefalea súbita e intensa. La presentación clínica puede iniciarse con una pérdida de consciencia brusca. Si esta pérdida de consciencia no se reestablece rápidamente es un indicador de gravedad y mal pronóstico.

Otros síntomas son: síndrome confusional, déficits neurológicos focales (como la parálisis oculomotora del tercer par craneal en relación a aneurismas en el origen de la arteria comunicante posterior) o ataques epilépticos ¹³³. Las hemorragias vítreas (síndrome de Terson) ocurren en aproximadamente el 17% de los pacientes. La rigidez de nuca es común en cualquier forma de HSAa, pero tarda entre 3 y 12 horas en aparecer desde el inicio de la cefalea y puede no aparecer en pacientes comatosos o en pacientes con escasa hemorragia.

Las manifestaciones sistémicas en la fase aguda de la HSAa incluyen la hipertensión arterial, cambios electrocardiográficos que pueden simular un infarto de miocardio, o la hipoxemia. En un 3% de los pacientes se produce una parada cardiaca en el momento del sangrado. La reanimación cardiopulmonar es esencial porque la mitad de los supervivientes de esta parada pueden recuperarse de la hemorragia sin déficits neurológicos ¹³⁴.

Las “cefaleas centinela” han sido también motivo de estudio definiéndose como episodios de cefalea intensa que preceden en días o semanas al episodio de sangrado. En un estudio de casos y controles, el 43% de pacientes ingresados por HSAa recordaban

haber presentado uno de estos episodios de cefalea, frente a un 5% de pacientes ingresados por ictus y ninguno de los ingresados por otras causas ⁸¹. El antecedente de cefalea centinela no parece afectar a la evolución o al pronóstico ¹³⁶.

Es importante estimar el grado clínico de cada paciente tras el sangrado, ya que existe una buena correlación entre el grado clínico inicial y la evolución final. A lo largo de los años se han propuesto multitud de clasificaciones y, aunque no existe una escala perfecta, hoy día las más validadas son la de Hunt y Hess ⁵⁷ y la propuesta por la Federación Mundial de Sociedades Neuroquirúrgicas (WFNS) ¹¹⁰, basada en la escala de coma de Glasgow, cuya puntuación desglosada debe quedar también registrada. Por otro lado, la escala modificada de Fisher ³⁷ que, basándose en la cuantificación del depósito hemático en el espacio subaracnoideo, predice el riesgo de vasoespasma angiográfico ⁷⁶ (Fig 1).

6. DIAGNÓSTICO

Las guías de manejo de la HSAa ⁷⁶ indican que la primera prueba a solicitar ante una sospecha de HSAa es la tomografía computarizada craneal sin contraste (TC). En las primeras 24 horas tras el sangrado su sensibilidad es mayor del 95% y disminuye con el transcurso de los días debido a la lisis de los hematíes, de manera que detecta el 57% de los casos a los 6 días del sangrado.

Si en la TC craneal se confirma el diagnóstico, se recomienda llevar a cabo a continuación un AngioTC. Esta prueba presenta una sensibilidad mayor del 80% para la detección de aneurismas. Se utiliza en ocasiones como única prueba previa a la cirugía en los casos en los que no está justificado el retraso en la cirugía para realizar una angiografía cerebral, que continúa siendo la prueba de elección para el diagnóstico y caracterización de aneurismas cerebrales (Fig 2).

Como inconvenientes, el AngioTC tiene menor sensibilidad que la angiografía para aneurismas pequeños, en general menores de 3 mm ¹²⁵. Como ventajas respecto a la angiografía, es superior en la visualización de calcificaciones de la pared del aneurisma, trombos intraluminales y en la localización espacial respecto a estructuras óseas ⁷⁶.

GLASGOW COMA SCALE (GCS)

La escala de coma de Glasgow representa la suma de la valoración de tres respuestas: respuesta ocular + respuesta verbal + respuesta motora.

<i>Respuesta ocular</i>		<i>Respuesta verbal</i>		<i>Respuesta motora</i>	
Espontánea	4	Orientada	5	Obedece órdenes	6
Al habla	3	Confusa	4	Localiza	5
Al dolor	2	Incoherente	3	Retirada	4
No respuesta	1	Incomprensible	2	Flexión anormal	3
		Sin respuesta	1	Extensión anormal	2

ESCALA DE HUNT Y HESS

- 0- Aneurisma no roto.
- I- Asintomático o cefalea leve y/o rigidez leve de nuca.
- Ia- Ausencia de reacción meníngea o cerebral, pero presencia de un déficit neurológico fijo.
- II- Parálisis de pares craneales, cefalea moderada o intensa o/y meningismo moderado severo.
- III- Déficit focal leve, letargia o confusión.
- IV- Estupor, hemiparesia moderada o grave, o rigidez precoz de descerebración.
- V- Coma profundo, rigidez de descerebración, aspecto moribundo.

WORLD FEDERATION OF NEUROLOGICAL SURGEONS (WFNS)

- I- GCS 15, sin déficit motor.
- II- GCS 14-13, sin déficit motor.
- III- GCS 14-13, con déficit motor.
- IV- GCS 12-7, con o sin déficit motor.
- V- GCS 6-3, con o sin déficit motor.

ESCALA DE FISHER

- 1- No se detecta sangre en la TC craneal.
- 2- Capas difusas o verticales < 1 mm de grosor.
- 3- Coágulos localizado o/y capa vertical > 1mm de grosor.
- 4- Coágulo intracerebral o intraventricular con HSA difusa o sin ella.

Figura 1: Escalas más utilizadas en relación a la HSAa ⁷⁶. PMID: 21597651.

7. TRATAMIENTO

7.1. Tratamiento médico.

El manejo de un paciente que presenta una ruptura aneurismática es complejo. Su tratamiento es un campo en constante evolución. De manera resumida, las guías de tratamiento recomiendan ^{76, 125}:

a) Traslado del paciente a un hospital con experiencia en el tratamiento de pacientes con HSAa, que disponga de Neurocirugía, Unidad de Cuidados intensivos (UCI), y Neurorradiología intervencionista.

b) Manejo intensivo de la presión arterial sistémica y el volumen circulatorio. Antes de la obliteración del aneurisma debe mantenerse un delicado equilibrio que evite la hipertensión con riesgo de resangrado y la hipotensión con riesgo de isquemia cerebral. Las guías europeas marcan una presión arterial sistólica (PAS) máxima de 180 mm Hg.

La presión arterial media (PAM) debe encontrarse entre 90-110 mm Hg para mantener una adecuada presión de perfusión cerebral. Los fármacos recomendados para el manejo de la presión arterial son el labetalol, nicardipino, esmolol o el propio nimodipino. Respecto al volumen circulatorio, se recomienda la euvolemia y no la hipervolemia.

c) Administración de nimodipino oral, en cuanto sea posible. La dosis indicada es de 60 mg cada 4 horas durante 3 semanas. Si no puede administrarse de forma oral, la segunda opción es nimodipino intravenoso. El nimodipino es el único fármaco hoy en día que ha demostrado disminuir la incidencia de infartos cerebrales y mejorar el pronóstico en la HSAa. Es un fármaco de la familia de las dihidropiridinas, calcioantagonistas o bloqueantes de los canales de calcio, fármacos utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial.

d) Cuando el paciente presenta hidrocefalia aguda sintomática debe tratarse mediante la colocación de un DVE.

e) Vigilancia intensiva de la temperatura y la glucemia: normotermia y normoglucemia.

f) Tratamiento del aneurisma cerebral, quirúrgico o endovascular, tan pronto como sea logísticamente posible, al menos en las primeras 72 horas.

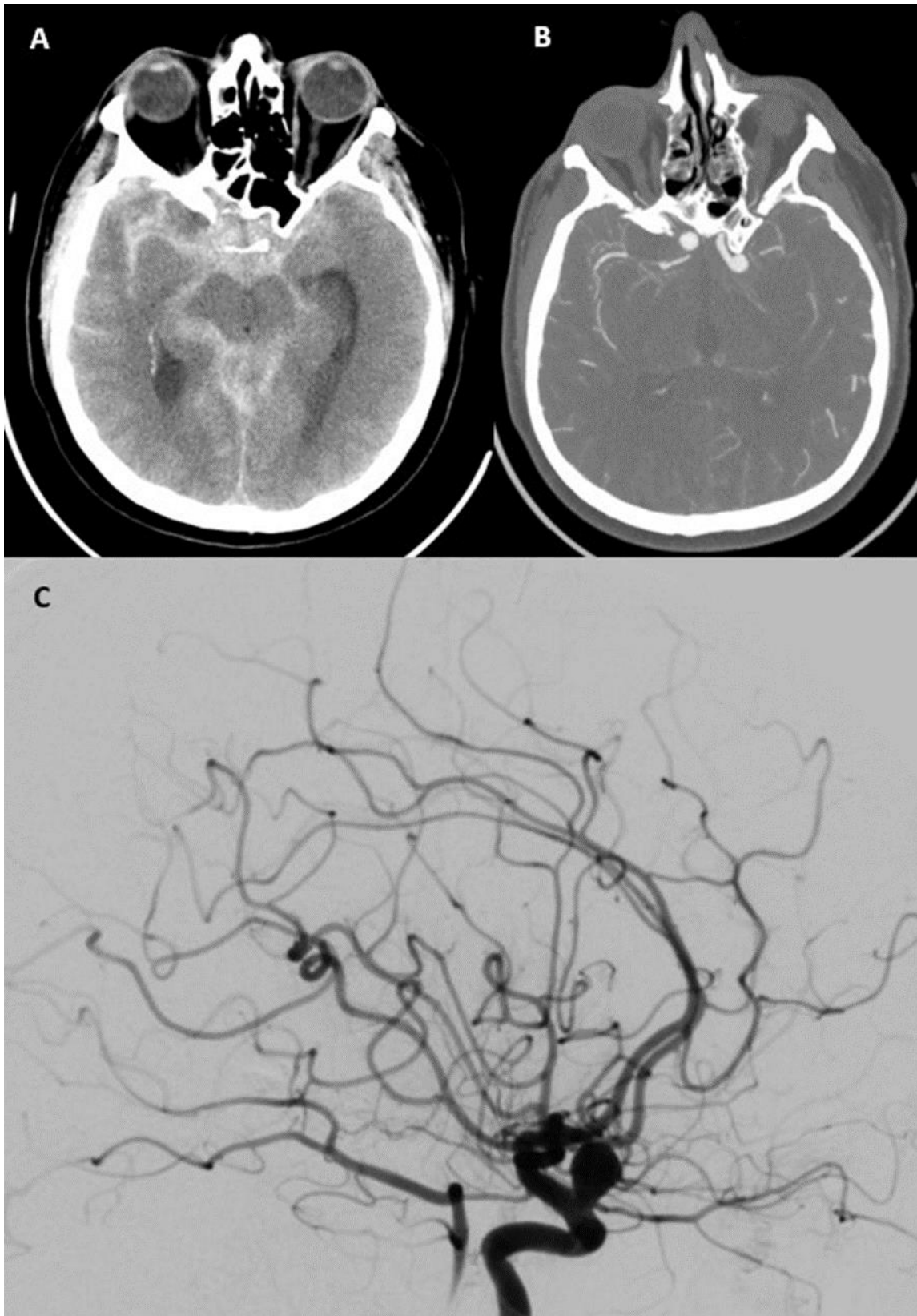


Figura 2: (A) TC craneal sin contraste en la que se observa la hiperdensidad característica de la sangre que se distribuye a través de las cisternas basales en la HSAa. (B) AngioTC en la que se aprecia un aneurisma de arteria carótida interna derecha. (C) Angiografía cerebral: Imagen en proyección lateral. Se aprecia un aneurisma sacular en el segmento paraoftálmico de la arteria carótida interna derecha. Servicio de Radiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

g) Cuando existe vasoespasma angiográfico y es sintomático, si el paciente no responde a tratamiento para aumentar la presión arterial, está aceptado el tratamiento endovascular intervencionista mediante angioplastia con balón o mediante administración arterial selectiva de vasodilatadores. No está indicado el tratamiento endovascular intensivo del vasoespasma de manera profiláctica (Fig 3).

La terapia “triple H” (hipertensión, hipervolemia y hemodilución) carece en realidad de evidencia firme ⁸⁵. Deben mantenerse valores normales y evitarse la hipotensión y la hipovolemia. Una vez el aneurisma ha sido tratado, si aparecen signos de isquemia cerebral sí debe inducirse una hipertensión controlada.

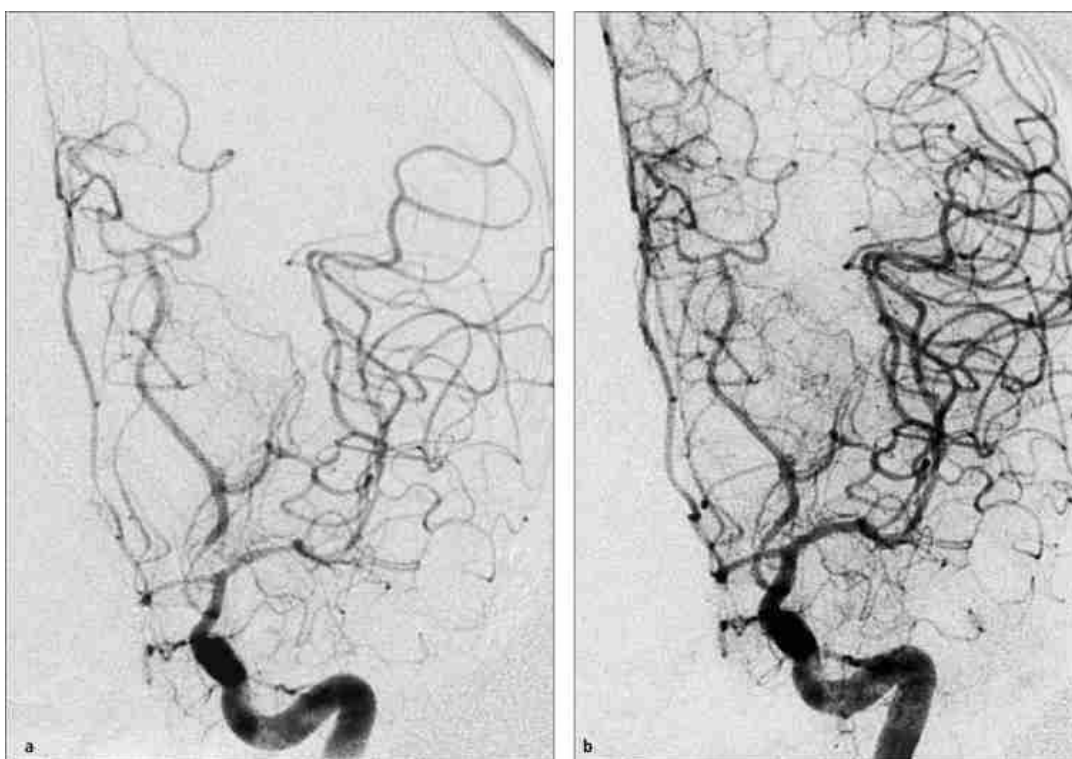


Figura 3. (a) Angiografía cerebral carotídea izquierda que muestra un vasoespasma severo de arteria cerebral media y cerebral posterior izquierda. (b) Misma proyección de angiografía cerebral tras realización de angioplastia cerebral farmacológica con nimodipino intra-arterial. Se observa una mejoría significativa en el calibre de los vasos principales y de la perfusión periférica con un mayor relleno del árbol vascular. Servicio de Radiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

7.2. Tratamiento específico del aneurisma cerebral.

El AI causante de la HSAa debería ser tratado lo antes posible para reducir el riesgo de resangrado, siendo recomendable hacerlo en las primeras 72 horas tras la

ruptura. Sin embargo, parece no haber diferencias en el pronóstico entre un tratamiento ultra-precoz (< 24 horas) frente a un tratamiento precoz (entre 24 y 72 horas) ¹⁰⁹.

En la decisión de tratar el aneurisma no debería influir el grado clínico del paciente al ingreso, ya que se ha comprobado que un 20-40% de los pacientes que ingresan con mal grado clínico (grado 5 de la escala WFNS) presentan una buena recuperación o incapacidad leve si se realiza un tratamiento médico y quirúrgico agresivo ⁷⁶.

Excluir el aneurisma de la circulación cerebral puede realizarse de manera general de modo quirúrgico o endovascular. El tratamiento quirúrgico más frecuente es la colocación de un clip metálico en el cuello del aneurisma (clipaje). Existen otras técnicas, como la colocación de dos clips, antes y después de la salida del aneurisma (atrapamiento, o trapping), la realización de by-pass o la ligadura de la arteria carótida. El recubrimiento del aneurisma (coating) o el empaquetamiento (wrapping) no se recomiendan actualmente. El tratamiento endovascular más frecuente es el relleno del saco aneurismático con coils (espirales) y, menos frecuente, la colocación de uno o varios stent ¹²⁵ (Fig 4).

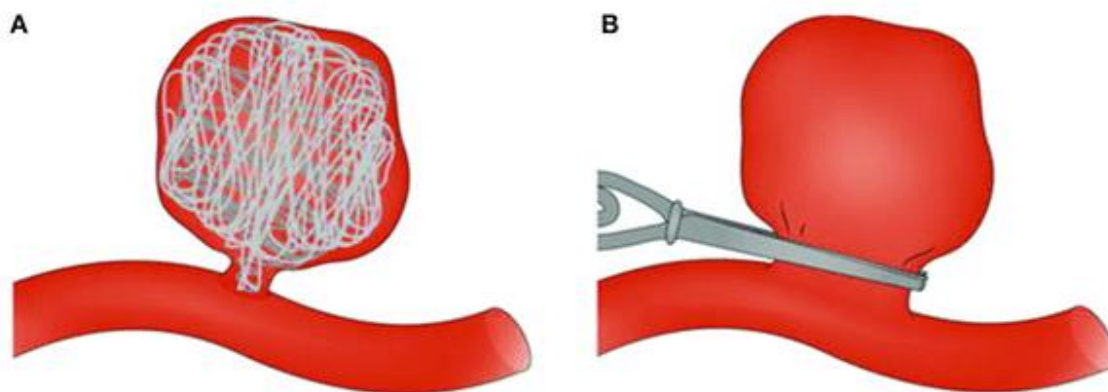


Figura 4. (A) Dibujo esquemático de un aneurisma embolizado mediante coils y (B) de otro clipado quirúrgicamente. Ambos creados por la autora con Biorender®.

La elección entre tratamiento quirúrgico o endovascular continúa siendo objeto de debate hoy en día. En lugar de determinar la superioridad general de una técnica sobre la otra, parece más interesante definir características de pacientes y aneurismas más adecuados para una u otra modalidad de tratamiento. Las guías de tratamiento europea y norteamericana ¹²⁵ indican que la decisión debería realizarse de manera multidisciplinar

entre especialistas en neurocirugía vascular y radiología intervencionista. Sugieren que serían favorables a un tratamiento quirúrgico los aneurismas de arteria cerebral media, los de la arteria pericallosa, los que asocian hematomas intracerebrales, los de cuello ancho y aquellos en los que surjan ramas distales directamente del saco aneurismático. En cambio, el tratamiento endovascular parece preferible en los pacientes de edad más avanzada (mayores de 70 años), en los que presentan mal grado clínico (grados 4/5 de la escala WFNS), en los aneurismas de circulación posterior y en los de cuello estrecho ¹¹⁶. Por otro lado, el tratamiento endovascular también es menos favorable en aneurismas muy grandes, o muy pequeños (<3 mm).

El ensayo clínico aleatorizado más extenso sobre este tema ha sido el ISAT (*International Subarachnoid Aneurysm Trial*) ^{94, 95}, realizado en 42 centros europeos. En este ensayo, se aleatorizaron únicamente los pacientes con HSA aneurismática en los cuales el neurocirujano y el radiólogo intervencionista estuviesen de acuerdo en que el caso fuese igualmente adecuado para tratamiento quirúrgico o endovascular. De esta manera, se incluyeron 2143 de los 9559 pacientes con HSA aneurismática atendidos, aproximadamente un 22%. Se incluyeron 1073 pacientes en el grupo de tratamiento endovascular y 1070 en el grupo de tratamiento quirúrgico. Se evaluó la mortalidad y la morbilidad, también el riesgo de resangrado y de crisis epilépticas. En el primer trabajo publicado en 2005 ⁹⁴, se describieron los resultados con la evolución al año del tratamiento, se describió una reducción del riesgo de muerte o dependencia de un 30.9% en el brazo quirúrgico a un 23.5% en el brazo endovascular (reducción del riesgo 7.4%, $p=0.0001$, reducción relativa del riesgo: 24%). El riesgo de crisis epilépticas fue mayor en el grupo quirúrgico, y en cambio el riesgo de resangrado fue mayor en el grupo endovascular (2.9% frente a 0.9%).

Años después, en 2009, se publicó su segunda parte con los resultados de la evolución a los 5 años del tratamiento ⁹⁵. Se evidenció que la proporción de supervivientes neurológicamente independientes no fue significativamente diferente entre los grupos, siendo del 83% para el tratamiento endovascular y del 82% para el tratamiento quirúrgico.

Actualmente se encuentra en marcha el ensayo ISAT-2, que tiene como objetivo incluir una variedad de pacientes mayor que la población altamente seleccionada del ISAT. Todos los pacientes que pudieran ser intervenidos tanto quirúrgica como endovascularmente son considerados para inclusión. El estudio excluye pacientes en grado clínico 5 de la escala WFNS. El ensayo se lleva a cabo en 2 hospitales españoles y

2 canadienses. Hasta el momento se han publicado los resultados preliminares, con la información de 103 pacientes que han completado un año de seguimiento ²³. Los resultados del pronóstico a los 12 meses revelan de nuevo una mejor evolución en el grupo de tratamiento endovascular, con menor estancia hospitalaria en este grupo, pero con menor frecuencia de oclusión completa.

8. PRONÓSTICO

Aunque el pronóstico de los pacientes que presentan HSA aneurismática ha mejorado en las últimas décadas, aproximadamente un tercio de los pacientes fallece en las primeras horas o días tras la hemorragia. Alrededor de un 10-15% de los pacientes fallece antes de llegar al hospital. El porcentaje de fallecimientos sumado a aquellos que sobreviven con secuelas permanentes alcanza el 50%. La HSAa incide en población más joven (mediana de edad 55 años) que el resto de ictus, por ello provoca una considerable pérdida de años potenciales de vida perdidos y también un gran gasto sanitario. Además, se ha demostrado que los pacientes que sobreviven a la HSAa a largo plazo tienen mayor riesgo de nuevos eventos vasculares (nueva HSAa o ictus) y de mortalidad precoz ^{49, 64}.

Se han estudiado gran cantidad de factores pronósticos en la HSAa. Un modelo predictivo descrito en 2018 en forma de calculadora pronóstica es el llamado SAHIT (*Subarachnoid Haemorrhage International Trialists*) ⁶⁴. Se ha obtenido de una gran base de datos colaborativa multinacional. Su cohorte de desarrollo consta de 10936 pacientes y la cohorte de validación de 3355. Los factores que se introducen en esta calculadora son: edad (variable continua), grado clínico al ingreso (medido en la escala WFNS, antecedente de hipertensión arterial, volumen de hemorragia en TC craneal (medido mediante la escala de Fisher), tamaño del aneurisma (≤ 12 mm, 13-24 mm, ≥ 25 mm), localización del aneurisma (arteria cerebral anterior (incluyendo arteria comunicante anterior), arteria carótida interna, arteria cerebral media, o circulación posterior), y método de tratamiento (quirúrgico, endovascular, o tratamiento conservador). El modelo calcula el pronóstico a los 3 meses medido mediante la escala GOSE (Glasgow outcome scale extended) ¹⁴⁶ o la mortalidad (Tabla 1).

Una mala situación neurológica del enfermo cuando ingresa en el hospital o “grado clínico”, la edad avanzada, un mayor volumen de sangrado en la TC craneal (grados 3 y 4 de Fisher), los antecedentes médicos previos del paciente (hipertensión), las

complicaciones de la HSAa (resangrado, hidrocefalia) o las complicaciones sistémicas se han relacionado con un peor pronóstico ⁷⁵.

Tabla 1: Escala GOSE (Glasgow outcome scale extended) ¹⁴⁶. doi: 10.1089/neu.1998.15.573.

1	Muerte.
2	Estado vegetativo persistente.
3	Discapacidad grave. Totalmente dependiente para las actividades básicas de la vida diaria.
4	Dependiente para algunas actividades. Pueden cuidar de sí mismos.
5	Discapacidad moderada. Incapacidad para trabajar y/o participar en actividades sociales.
6	Vuelta al trabajo con capacidad reducida. Reducción en las actividades sociales.
7	Buena recuperación con déficits neuropsicológicos menores.
8	Buena recuperación sin déficit.

LOS ANEURISMAS INTRACRANEALES

La palabra aneurisma proviene del griego *aneurysma*, que significa dilatación. Los aneurismas se definen como la presencia de una protuberancia o abombamiento anormal en las paredes de un vaso sanguíneo que se ha relacionado con la existencia de una debilidad en la pared de dicho vaso. Sin embargo, los procesos fisiopatológicos que dan lugar a este tipo de patología no son del todo conocidos ⁴⁹.

Los aneurismas intracraneales son relativamente frecuentes: numerosos estudios estiman su prevalencia en el 2-3% de la población adulta ¹⁵³. Aproximadamente un 20-30% de estas personas presenta más de un aneurisma. Se presentan con mucha más frecuencia en el compartimento intracraneal que en los vasos sanguíneos del resto del cuerpo. Una posible explicación es que los vasos sanguíneos intracraneales presentan una estructura en su pared muy peculiar que los distingue del resto. Los estudios histopatológicos han demostrado que los aneurismas intracraneales, al contrario de los encontrados en otros lugares, presentan una túnica media muy disminuida, junto con una lámina elástica interna muy fragmentada o ausente ⁸⁴. Esto favorecería su formación, crecimiento y ruptura.

De acuerdo a su presentación, los AI se pueden clasificar en: no rotos, los cuales en la mayoría de los casos son hallazgos incidentales al realizar un estudio de imagen cerebral (tomografía axial computarizada, resonancia magnética) con otros fines diagnósticos; y los rotos, que habitualmente producen una hemorragia subaracnoidea aneurismática (HSAa) que se manifiesta con cefalea intensa, náuseas, vómitos, déficit neurológico focalizado y pérdida de la consciencia, entre otros ⁴².

1. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ANEURISMAS INTRACRANEALES

Los factores de riesgo de presentar AI se han clasificado tradicionalmente en modificables y no modificables.

- **Modificables:** los más conocidos son el tabaquismo, la hipertensión, el consumo excesivo de alcohol o el uso de drogas simpático-miméticas como la cocaína. Otros factores asociados son la aterosclerosis y el sobrepeso ³⁴.
- **No modificables:** la predisposición familiar o la historia familiar de aneurismas (es decir, el antecedente en un miembro de la familia sin identificarse una enfermedad concreta). Los familiares de primer grado de pacientes que han presentado HSAa tienen un riesgo 7 veces mayor que la población general de presentar esta enfermedad ¹³³. Sin embargo, en familiares de segundo grado la incidencia de HSAa es similar a la población general.

La predisposición genética está bien demostrada, ya que los familiares de un paciente con un aneurisma cerebral tienen un riesgo significativamente aumentado de presentar también aneurismas. Se estima que la prevalencia de aneurismas cerebrales en la población general se encuentra entre el 2% y el 3%. Esta proporción se estima que asciende al 4% en población con un familiar afectado y al 8% si son dos los familiares con aneurismas cerebrales ¹⁵³. Además, en este subgrupo de pacientes (aquellos con antecedentes familiares) se observa una ruptura de los AI a una edad más temprana, mayor tamaño en el momento de la ruptura, mayor frecuencia de aneurismas múltiples y mayor frecuencia de aneurismas de arteria cerebral media ¹³³.

Existen también enfermedades genéticas monogénicas que se asocian a un mayor riesgo de presentar AI, pero que consideradas en conjunto serían responsables de menos del 1% de los casos. Son enfermedades todas ellas de herencia autosómica dominante y que afectan al tejido conjuntivo. La enfermedad que con mayor frecuencia se asocia a la presencia de AI es la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (poliquistosis renal), con una prevalencia de IA de aproximadamente el 11% ¹³³. Otras enfermedades genéticas asociadas menos frecuentemente a HSA son la enfermedad de Ehlers-Danlos tipo IV, la neurofibromatosis tipo 1, la telangiectasia hemorrágica hereditaria (síndrome de Rendu-Osler-Weber) o displasia fibromuscular, pero la relación es menos clara que en la poliquistosis renal y suponen un porcentaje de casos todavía menor. La enfermedad de Marfan también se ha relacionado con la HSA, sin embargo, esta asociación es todavía más débil.

En resumen, los riesgos relativos para los factores de riesgo descritos previamente son: 6.6 para la historia familiar positiva, 4.4 en la poliquistosis renal, 5.6 en el consumo excesivo de alcohol, 2.8 en la hipertensión y 1.9 en el tabaquismo ¹¹⁶.

De acuerdo con estos datos, la guía europea de manejo de la HSAa en su última edición ¹²⁵ recoge la recomendación de realizar el cribado en personas con 2 o más parientes de primer grado que han presentado AI, o en pacientes con poliquistosis renal (recomendación de clase III) y no realizar cribado si solo un familiar está afectado. Dicho cribado se propone a partir de los 20 años, cada 7 años si las pruebas radiológicas son negativas, y en general hasta los 80 años. La prueba diagnóstica de elección para el cribado es la angiografía por resonancia magnética ¹¹¹.

2. TIPOS DE ANEURISMAS INTRACRANEALES

De acuerdo con su forma, existen tres tipos de aneurismas cerebrales ¹⁵² (Fig 5):

- Aneurisma sacular. Se caracteriza por tener la forma de un saco unido por el cuello a la arteria de origen, generalmente en las bifurcaciones, aunque se puede encontrar en cualquier segmento de las arterias intracraneales. Son los más frecuentes en la circulación cerebral.

- Aneurisma fusiforme. Formado por el ensanchamiento circunferencial del vaso.
- Aneurisma lateral o disecante: A diferencia de los dos anteriores en los cuales las tres capas de la pared arterial forman el aneurisma, se originan por un desgarro en el endotelio y crecen al introducirse sangre en su espesor entre las capas de la pared.

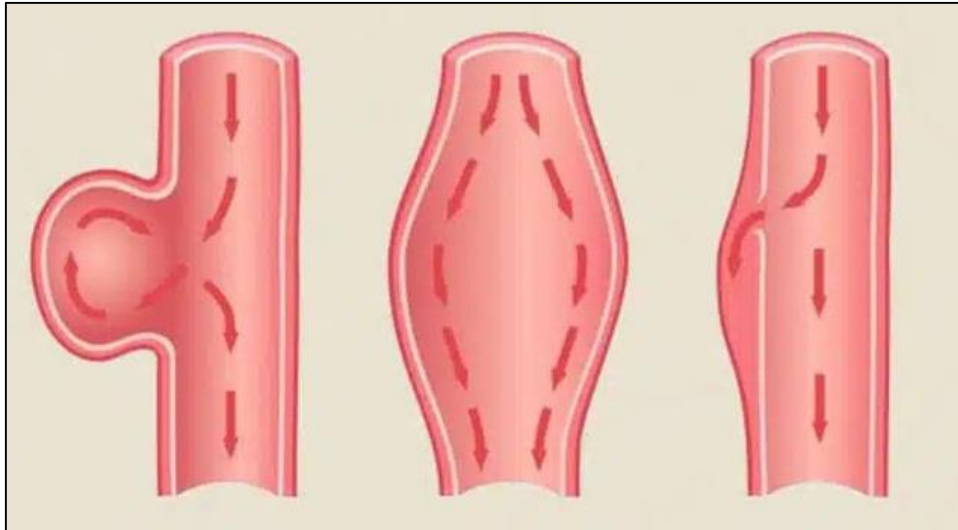


Figura 5: Dibujo esquemático de un aneurisma sacular, fusiforme y disecante respectivamente. Creado por la autora con Biorender ®.

Según su tamaño. Se clasifican en:

- Microaneurismas (< 3 mm).
- Pequeños (4 a 6 mm).
- Medianos (7 a 10 mm).
- Grandes (11 a 24 mm).
- Gigantes (> 25 mm).

Según su localización:

- Circulación anterior: sistema carotídeo y sus ramas. La localización más frecuente es en la arteria carótida interna (85-95%), seguido de la arteria comunicante anterior (30%), arteria comunicante posterior (25%) y arteria cerebral media (20%).
- Circulación posterior: sistema vertebro-basilar (tan sólo 5-15% de los casos).

3. FACTORES DE RIESGO PARA LA RUPTURA DE UN ANEURISMA INTRACRANEAL

3.1 Demográficos (edad, género, población, tamaño y localización).

En la actualidad, cada vez se diagnostican con mayor frecuencia pacientes con AI no rotos y asintomáticos. El riesgo de ruptura debe ser sopesado con cautela frente al riesgo inherente de tratar el aneurisma. Esto explica el gran esfuerzo investigador dedicado a conocer la historia natural de los aneurismas no rotos y al estudio de factores predictivos de ruptura del aneurisma cerebral: el escenario ideal sería poder discernir perfectamente aquellos aneurismas que se romperán de los que nunca lo harán, y tratar únicamente los primeros.

La revisión más extensa realizada hasta la fecha y publicada en 2014 por Greving y col. incluye en su análisis 8439 pacientes, que proceden de 6 cohortes prospectivas previas: el ISUIA (*International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms*) (Norteamérica y Europa), 3 cohortes japonesas, una finlandesa y una holandesa. Del análisis de estas 6 cohortes surge la escala de puntuación PHASES (*Population, Hypertension, Age, Size, Earlier subarachnoid hemorrhage, Site*). Se trata de una escala que estima el riesgo de ruptura de un aneurisma en 5 años, basado en la puntuación de estos 6 factores: población o región geográfica, hipertensión arterial, edad, tamaño, historia de HSA previa y localización ⁴⁶ (Tabla 2).

En resumen, entre los factores de riesgo de ruptura, las variables significativas son: población o región geográfica (población japonesa o finlandesa), la presencia hipertensión arterial, edad >70 años, tamaño >7mm, historia de HSA previa y localización (arteria cerebral media, arteria cerebral anterior, arteria comunicante posterior y circulación posterior).

El tabaquismo ha sido consistentemente descrito como factor de riesgo de ruptura ⁶⁷, y en menor medida el consumo excesivo de alcohol en algunos estudios. Se debe aconsejar a todos los pacientes el tratamiento de la hipertensión arterial y dejar de fumar.

Tabla 2. Escala PHASES. Cada categoría suma un puntaje determinado y con el recuento final se adjudica un riesgo de ruptura del AI. ≤ 2 puntos, 0.4%, 3 puntos 0.7%, 4 puntos 0.9%, 5 puntos 1.3%, 6 puntos 1.7%, 7 puntos 2.4%, 8 puntos 3.2%, 9 puntos 4.3%, 10 puntos 5.3%, 11 puntos 7.2% y ≥ 12 puntos 17.8% ⁴⁶ (doi: 10.1016/S1474-4422(13)70263-1).

ORIGEN	
Norte americano o Europeo (no finés)	0
Japonés	3
Finés	5
HIPERTENSIÓN	
No	0
Si	1
EDAD	
< 70 años	0
≥ 70 años	1
TAMAÑO DEL ANEURISMA	
< 7mm	0
7-9.9 mm	3
10-19.9 mm	6
≥ 20 mm	10
ANTECEDENTES DE HSAa POR OTRO ANEURISMA	
No	0
Si	1
LOCALIZACIÓN DEL ANEURISMA	
Arteria carótida interna	0
Arteria cerebral media	2
Arteria comunicante anterior, comunicante posterior o circulación posterior	4

3.2 Biofísicos.

La ruptura de un aneurisma está determinada por una ecuación de enorme complejidad que incluye factores tales como la morfología del aneurisma, aspectos hemodinámicos como las configuraciones de presión, el grosor y elasticidad de las paredes de la arteria, el diámetro, lumen y tipo de arteria de la cual se origina el aneurisma. A todos estos, se suman aspectos genéticos, moleculares y tisulares. Todos ellos serán desarrollados en el siguiente apartado.

4. MECANISMO DE FORMACIÓN DE UN ANEURISMA INTRACRANEAL

A continuación, nos centraremos en los aneurismas de tipo sacular, que son los más frecuentes en la circulación cerebral. Los aneurismas fusiformes cerebrales tienen una patogénesis diferente, que está más relacionada con la arterioesclerosis, las enfermedades del tejido conectivo o infecciones. Su presentación clínica también puede ser diferente, siendo frecuente su diagnóstico por déficits focales por efecto de masa o por isquemia-oclusión arterial ¹⁰³.

Independientemente de los factores predisponentes o asociados a la presencia de un aneurisma intracraneal, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la formación y progresión de un aneurisma aún no han sido del todo clarificados; sin embargo, han sido propuestas diversas hipótesis que tratan de explicar el origen y desarrollo de este tipo de alteraciones vasculares tomando en cuenta los estudios histopatológicos y los modelos experimentales.

En términos generales, podemos mencionar cuatro fases en el mecanismo de formación de un aneurisma:

1. Aspectos genéticos.
2. Factores histológicos, citológicos y moleculares.
3. Proceso inflamatorio.
4. Alteraciones biomecánicas.

4.1 Aspectos genéticos.

Los AI raramente son lesiones congénitas ¹⁴³. La inmensa mayoría de los AI son adquiridos y es muy infrecuente que estén presentes al nacimiento. Por ello, y debido a que los factores implicados en su génesis parecen requerir años de latencia, los aneurismas son infrecuentes antes de la tercera década de la vida ³². Habitualmente se originan en la tercera o cuarta década, y pueden estabilizarse, crecer, o romperse.

La formación de aneurismas cerebrales parece deberse a una compleja interrelación entre factores genéticos predisponentes con factores hemodinámicos y ambientales. Son, por lo tanto, una enfermedad multifactorial, no genética con un patrón de herencia mendeliano, aunque sí existe un componente de predisposición genética que

puede causar defectos estructurales en los componentes de las paredes arteriales tales como el colágeno y la elastina, llevando a anomalías en la estructura^{117, 121}.

4.2 Factores histológicos, citológicos y moleculares.

La estructura de una arteria intracraneal consta de tres capas: íntima, media y adventicia. La íntima es la capa más interna que mira hacia el lado luminal y tiene contacto directo con el flujo sanguíneo. Está compuesto por una monocapa de células endoteliales y una matriz extracelular subendotelial. La capa media se compone principalmente de células musculares con una matriz extracelular que contiene predominantemente colágeno tipo III. La adventicia es la capa más externa y consta de una red compleja de fibras de colágeno tipo I, elastina, nervios y fibroblastos (Fig 6).

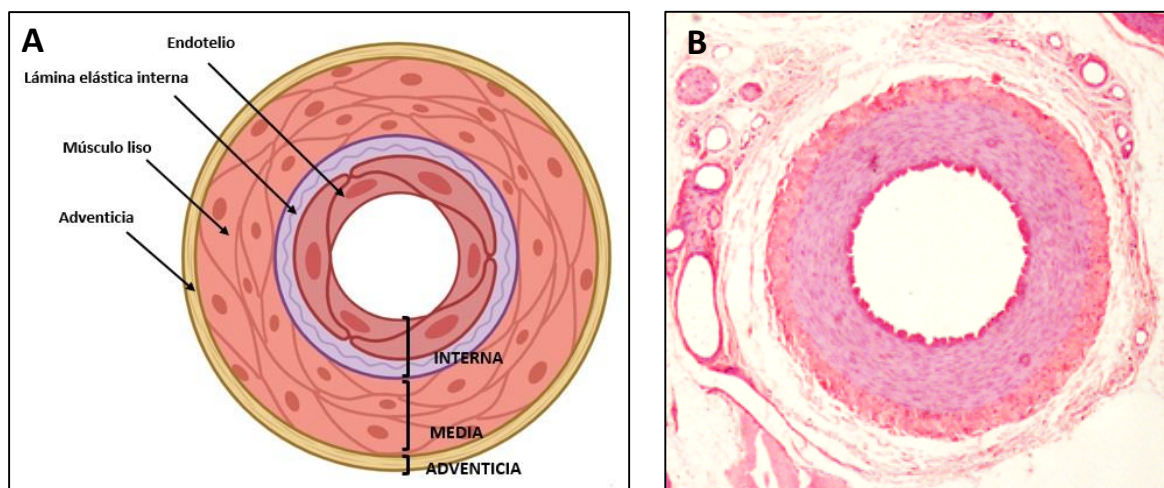


Figura 6: (A) Representación esquemática de un corte transversal de una arteria intracraneal y las diferentes capas que la conforman. Creado por la autora con Biorender®. (B) Sección transversal de parafina de una arteria cerebral con tinción de hematoxilina-eosina. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Es importante conocer que las arterias intracraneales carecen de lámina elástica externa, que separa la media de la adventicia en las arterias aórticas. Esta característica histológica hace que las arterias intracraneales sean más vulnerables a estrés hemodinámico y sean más propensas a desarrollar aneurismas, respecto al resto de arterias de la circulación sistémica^{15, 117}. Otros motivos son que la capa media posee una densidad menor de fibras elásticas, y la capa adventicia es delgada y fina. Además, las grandes arterias cerebrales discurren en el espacio subaracnoideo, rodeadas de líquido (LCR), mientras que las arterias sistémicas usualmente se encuentran rodeadas de tejido conjuntivo.

En el origen del AI, todo comienza con una lesión endotelial producida por los cambios hemodinámicos en la luz vascular. Estos cambios son detectados por mecanorreceptores que inician diferentes cascadas moleculares, por ejemplo, de apoptosis en el endotelio. El daño endotelial produce una disrupción o defecto en la lámina elástica interna. Las células musculares de la túnica media invaden la íntima a través de estos defectos y sufren un proceso de hiperplasia miointimal como respuesta adaptativa al daño estructural, cambiando su fenotipo de contráctil a secretor ¹⁸. Esto supone cambios bioquímicos (más proinflamatorios) y también morfológicos, ya que cambian su forma original en forma de huso a una parecida a una araña, lo que da como resultado una menor compactación y resistencia al estrés (Fig 7).

La pared arterial está formada principalmente por proteínas básicas de la matriz extracelular como son el colágeno y la elastina, las cuales determinan en gran medida las propiedades físicas de las paredes arteriales ⁴⁹. En condiciones normales, este tipo de proteínas son las responsables de mantener el tono arterial ante algún incremento en la presión transmural previniendo de esta forma la distensión excesiva y el ensanchamiento del vaso. Sin embargo, durante el mecanismo de producción de un AI, la túnica media sufre un proceso de desorganización por pérdida de células musculares lisas y de degradación de la matriz extracelular por una invasión de macrófagos en la pared arterial, liberando metaloproteinasas (MMP), unas enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular (colágeno y elastina). El efecto proteolítico de las MMP, sobretodo sobre el colágeno tipo I y III, reduce la resistencia tensil de la pared y causa la hialinización de la pared arterial por aumento de colágeno tipo I y V de la matriz extracelular ⁴⁹.

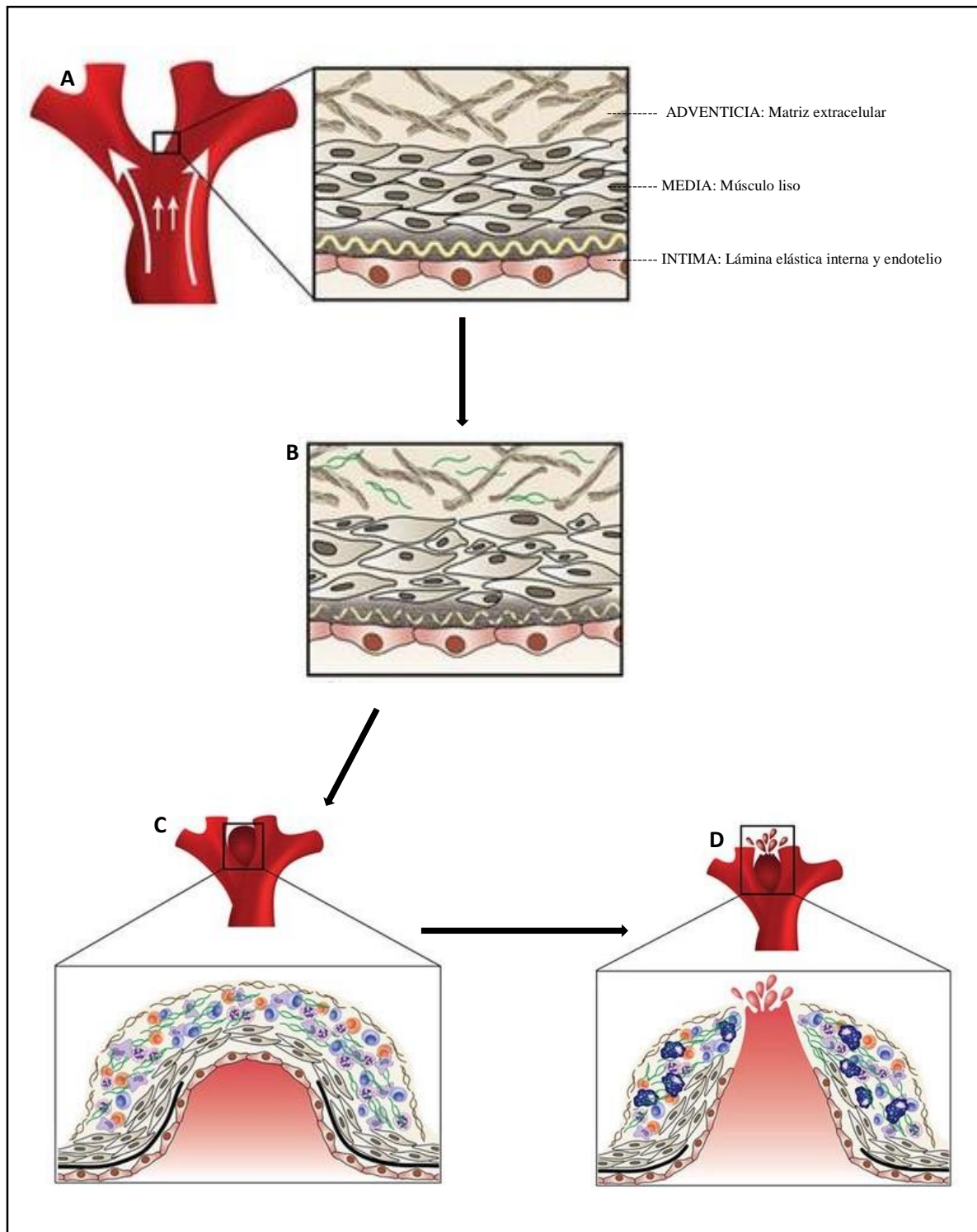


Figura 7. Mecanismo de degeneración histológica de la pared arterial durante el proceso de formación de un aneurisma. (A) Esquema de pared arterial sometida a estrés hemodinámico y ambiental. (B) Inicio de disfunción endotelial, lesión de la lámina elástica interna, hiperplasia miointimal en el músculo liso vascular y degradación de la matriz extracelular. (C) Formación del aneurisma mediante una respuesta inflamatoria que implica a varias citocinas, macrófagos, células T y mastocitos que provocan pérdida de células murales, degradación y ruptura de la lámina elástica interna, mayor inflamación y degeneración de la pared vascular. (D) Ruptura del aneurisma (Modificado de Chalouni et al ¹⁸. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002390).

4.3 Proceso inflamatorio

Todo el proceso de degradación histológica desarrollado previamente se agrava con una respuesta inflamatoria celular y humoral. Se ha demostrado por estudios inmunohistológicos y bioquímicos que las células que constituyen al vaso sanguíneo afectado por un aneurisma, presentan una importante producción de factores locales y moléculas bioactivas que pueden mantener y perpetrar un proceso inflamatorio local ⁴⁹. Además de los factores de crecimiento y citocinas producidos por las células inflamatorias (como TNF alfa, IL-1 beta, IL-6, metaloproteinasas de matriz), las células de los vasos sanguíneos presentan un aumento en la actividad de la ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y 2) ^{17, 18} así como un incremento en la tasa de producción de moléculas bioactivas como son el óxido nítrico y los radicales libres derivados del oxígeno. La inflamación parece jugar un papel fundamental en la progresión y la ruptura ⁴⁹.

Comparadas con arterias sanas, las que han desarrollado aneurismas muestran un aumento de marcadores de inflamación y apoptosis, y estructuralmente son poco celulares con predominio del colágeno (sobre todo colágeno tipo I) que conlleva la fibrosis de la pared. El aneurisma crece cuando se produce un desequilibrio entre procesos reparadores, eutróficos y procesos destructivos y distróficos, entre ellos la mencionada degradación de la matriz extracelular, la síntesis excesiva de colágeno, la progresiva pérdida de células musculares lisas y el aumento de células inflamatorias ^{17, 40}.

Cuando se establece un proceso inflamatorio crónico, éste es acompañado generalmente por un proceso de angiogénesis (formación de vasos sanguíneos de novo). Se ha observado que, en las inmediaciones del saco aneurismático, se presenta un alto grado de neovascularización y la presencia de un infiltrado inflamatorio, con un aumento local en la producción de citoquinas y citocinas tal como el interferón gamma (IFN- γ), el factor de crecimiento endotelial (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y las interleucinas tipo 2,4,5,10 y 13 ⁴⁹.

Con relación a la inflamación, algunos estudios han valorado la captación de contraste en resonancia magnética de la pared del aneurisma como marcador de inflamación. Un trabajo en una serie prospectiva de 108 aneurismas (87 pacientes), describió que la captación circunferencial de contraste (gadolinio) fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con crecimiento demostrado o rotos (en un 87%

de ellos) que en el grupo de pacientes con aneurismas estables sin crecimiento (aunque un 28% también presentó captación de contraste) ³¹.

En la última década se ha prestado gran atención al posible papel protector de la aspirina en la prevención del crecimiento y ruptura de aneurismas cerebrales ^{105, 124}. La aspirina es un potente inhibidor de las COX-1 y COX-2, cuyos niveles están aumentados en la pared de aneurismas rotos. Por el momento, ni la aspirina ni ningún otro fármaco está aceptado como tratamiento de los aneurismas no rotos, en la profilaxis del crecimiento o profilaxis de la HSAa. Dos meta-análisis recientes de 2017 ¹⁰⁵ y 2020 ¹⁰⁸ coinciden en sus resultados: la aspirina no mostró un efecto protector de la ruptura aneurismática (HSAa) a largo plazo, y por el contrario a corto plazo ambos describen un aumento de riesgo significativo de ruptura en el subgrupo de pacientes en los primeros 3 meses de tratamiento con aspirina (OR 1.61 y 1.697). Todos los autores coinciden en la necesidad de un ensayo clínico aleatorizado con aspirina.

4.4 Alteraciones biomecánicas

Si en la génesis de aneurismas solo interviniesen factores genéticos, epidemiológicos, como la edad o el género, y ambientales, como el tabaco o la hipertensión, puesto que todo el árbol vascular está expuesto a ellos, cabría esperar una distribución al azar y en cualquier localización de los AI. Sin embargo, no ocurre así, ya que los aneurismas cerebrales surgen en localizaciones preferentes, típicas y predecibles: regiones de alto estrés hemodinámico ⁹⁹. Estos lugares son las bifurcaciones arteriales (aneurismas de bifurcación o terminales), o el borde externo en una arteria que efectúa una curva en su trayecto (aneurismas laterales, o “*sidewall*” en inglés) ^{99, 132}. Existen poco más de una decena de localizaciones típicas de aneurismas cerebrales. Más del 60% de los aneurismas asientan en 4 localizaciones: la arteria comunicante anterior, la bifurcación de la arteria carótida interna, la bifurcación del segmento M1 de la arteria cerebral media y el origen de la arteria comunicante posterior.

El origen del aneurisma precisa de la interacción entre el particular flujo sanguíneo y el endotelio. No existe acuerdo, sin embargo, en explicar el evento inicial como un desgarro o solución de continuidad en el endotelio (producido por el flujo turbulento), o bien como un proceso por el cual los mecanorreceptores del tejido responden al estrés hemodinámico (tensión de pared) e inician una serie de reacciones moleculares en cadena

que provocan un segmento débil en la pared (defectos de la túnica media, o “*medial gaps*”) ^{92, 132}.

- Tensión de pared: La iniciación del aneurisma ocurre en zonas con mayor sobrecarga mecánica (“*Wall shear stress*”, WSS o estrés de cizallamiento) y comienza por una disrupción de la lámina elástica interna ^{18, 29}. La resistencia de la pared de la arteria cerebral depende de esta lámina elástica interna, que se encuentra entre la capa o túnica íntima y la capa media o muscular. La elasticidad de las arterias se ve favorecida por la disposición de las fibras elásticas, que siguen una dirección longitudinal en la lámina elástica interna y, en cambio, radial y concéntrica en la túnica media ¹⁵².

El WSS es una fuerza de fricción, tangencial a la pared, producida por el movimiento de un fluido en contacto con una superficie sólida ⁹². El WSS crece al aumentar la velocidad del fluido y su viscosidad. Como la viscosidad de la sangre es prácticamente constante, la velocidad cambiante del flujo sanguíneo, es decir, la presión arterial, es su principal determinante. El vaso sometido a un alto WSS activa mecanismos inflamatorios en el endotelio. Las células inflamatorias segregan citoquinas proinflamatorias que aumentan la permeabilidad luminal, así como metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y comienza la degeneración de la pared (Fig 8).

- Patrón del flujo sanguíneo: El patrón de flujo normal y fisiológico es el flujo laminar, en el cual el fluido avanza en capas paralelas siendo las líneas de flujo paralelas y el perfil

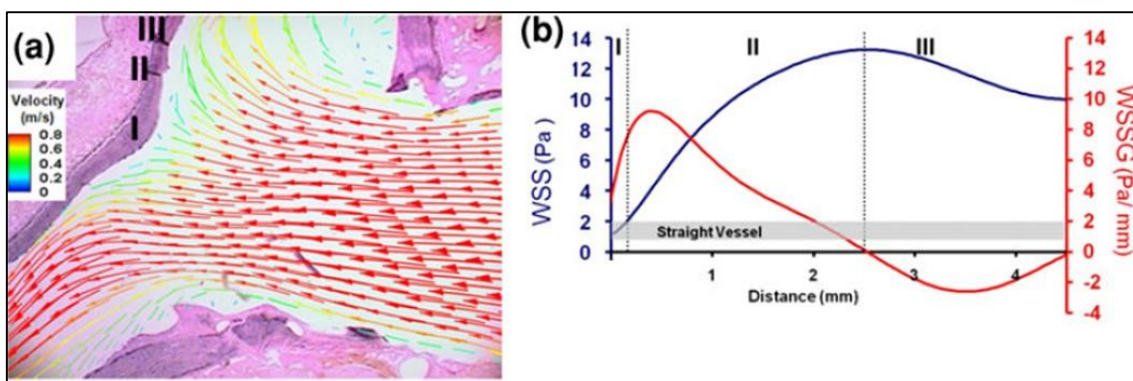


Figura 8: (a) Esquema histológico de una bifurcación arterial con los vectores de velocidad de flujo correspondientes. (b) Gráfico de WSS (rojo) que revela 3 regiones con distintos patrones de flujo y respuestas de remodelación (región I: la región de choque con respuestas hiperplásicas; Región II: región

de aceleración con remodelación tipo aneurisma y Región III: desaceleración del flujo y recuperación del flujo base sin cambios morfológicos) (Modificado de Meng et al.⁹¹. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.481234).

de velocidad parabólico: máximo en el centro del vaso y mínimo en contacto con la pared. Cualquier flujo no laminar es en general “turbulento”, las líneas de flujo pierden su paralelismo y los vectores de velocidad son variables y aleatorios en su interior. Se producen en lugares con geometría vascular compleja, como una bifurcación o un segmento post-estenótico. Dos tipos de flujo no laminar relevantes en la fisiopatología vascular son la recirculación y la separación de flujo⁹⁹. De la misma manera que el endotelio es capaz de responder a fuerzas como el WSS, se piensa que responde también a cambios en el patrón de flujo. El flujo laminar se asocia a un endotelio de aspecto celular normal (fusiforme), con alineación celular en la dirección del flujo, y que segrega sustancias que evitan la coagulación, agregación, adhesión celular y vasoconstricción¹³². Sin embargo, en respuesta a un flujo turbulento pierden esta orientación longitudinal y su forma cambia a una forma más bien cuboidal (Fig 9).

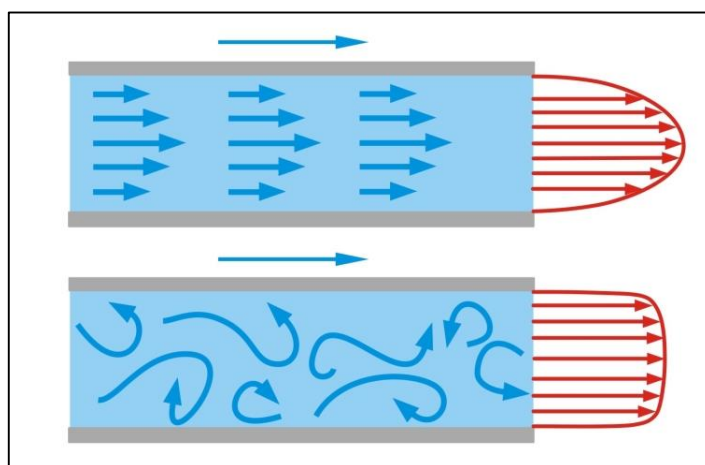


Figura 9. Comparación del perfil parabólico de un vaso con flujo laminar y otro con flujo turbulento. Se observa como en el segundo caso, el cambio en el patrón de flujo produce un aumento de la fricción interna entre el fluido y la pared (Modificado de Nixon et al.⁹⁹. doi: 10.3171/2009.10.JNS09759).

- Defectos de la túnica media o “medial gaps”: Se trata de una discontinuidad de la capa media observada al microscopio en el ápice de las bifurcaciones cerebrales. Como los aneurismas son muy frecuentes en las bifurcaciones cerebrales, se ha interpretado que estos defectos explican el origen. Sin embargo, ni todos los

aneurismas cerebrales se encuentran en bifurcaciones arteriales (hasta una cuarta parte son aneurismas laterales, o “*sidewall*”), ni las bifurcaciones arteriales en la circulación sistémica que también presentan frecuentemente “*medial gaps*” son asiento frecuente de aneurismas ^{15, 108} (Fig 10).

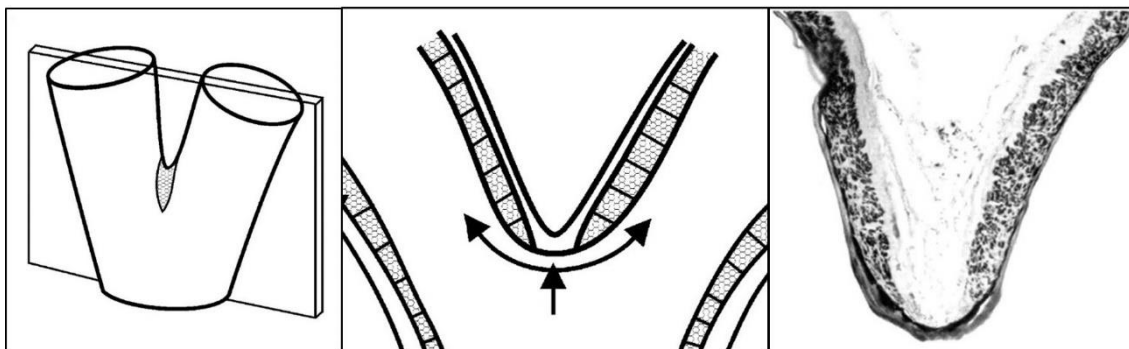


Figura 10. Vista lateral esquemática e histológica de una bifurcación arterial que muestra un defecto en la túnica media (“*medial gaps*”) (Modificado de Canham et al ¹⁵. doi: 10.1161/01.STR.0000124926.76836.df)

La mayoría de los aneurismas cerebrales (aproximadamente el 80%) se rompen en la región del fundus, la región más apical del saco aneurismático. El resto lo hacen en regiones más proximales cercanas al cuello, y solo en un 2% la ruptura ocurre en el cuello propiamente. Es interesante que, en las paredes de aneurismas no rotos, se han detectado células inflamatorias con un gradiente y proporción similares ¹³¹.

En cuanto al crecimiento de los aneurismas tampoco es un proceso completamente esclarecido. No crecen únicamente debido a una distensión mecánica de la pared por un aumento de la presión en el lumen. Existen evidencias que indican que es necesaria la proliferación celular en la pared y/o el aumento de síntesis de matriz extracelular ⁹². Los aneurismas se comportan a este respecto de manera muy variable ²: pueden crecer en horas o días tras su origen y romperse rápidamente, pueden presentar un crecimiento interrumpido por largos periodos de quiescencia, así como no crecer en absoluto y permanecer estables. En general, un aneurisma que crece lo llamamos “inestable”, ya que el crecimiento está tan asociado a la ruptura (multiplica el riesgo por 12) que en ocasiones se utiliza el crecimiento como variable subrogada de la ruptura ¹³⁷.

En diversos trabajos se han analizado los factores que hacen que un AI crezca. Entre ellos están el tabaquismo y el género femenino ¹⁹, la forma irregular o multilobulada ⁸, un mayor tamaño inicial, la localización en la circulación posterior ³ y la presencia de aneurismas múltiples ⁶⁶.

VULNERABILIDAD GENÉTICA FRENTE A LOS ANEURISMAS INTRACRANEALES

En un intento de entender los mecanismos genéticos que intervienen en el desarrollo de los aneurismas intracraneales, se han implementado estudios moleculares que han contribuido a establecer una probable asociación entre la presencia del aneurisma y la expresión de genes que funcionen como marcadores específicos dentro de la población, lo cual sería muy útil como medida de diagnóstico temprano.

Diversos estudios reportan que, además de los factores de riesgo ambientales, los factores genéticos podrían ser cruciales en la formación y evolución clínica de los AI^{98, 130}. Se ha estimado que en el 4,1-6,1% de los casos de formación y ruptura de AI hubo una contribución hereditaria^{4, 151} y que el resto de los casos podrían explicarse mediante interacciones entre mutaciones genéticas y factores ambientales⁷². Esto explica que los familiares de primer grado de los pacientes con HSAa tienen siete veces más riesgo de sufrir AI que la población general^{72, 73}. Además, Broderick et al. establecieron que el riesgo de HSAa es 17 veces mayor en pacientes con AI de herencia familiar que aquellos con AI esporádicos¹¹.

1. Alteraciones monogénicas

Se han identificado numerosas mutaciones monogénicas, poco frecuentes pero importantes, que originan alteraciones en la estructura vascular y condicionan la aparición de AI. Son enfermedades todas ellas de herencia autosómica dominante y que afectan al tejido conjuntivo. La más frecuente es la enfermedad renal poliquística (poliquistosis renal), con una prevalencia de IA de aproximadamente el 11%¹³³. Otras son la enfermedad de Ehlers-Danlos tipo IV, la neurofibromatosis tipo 1, la telangiectasia hemorrágica hereditaria (síndrome de RenduOsler-Weber) o displasia fibromuscular y la enfermedad de Marfán, que también se ha relacionado con la HSAa, aunque esta asociación es todavía más débil.

2. Polimorfismos

Un polimorfismo es una región del genoma que varía entre los diferentes individuos de una población. A cada posible variante se le denomina alelo.

Para que una variación pueda considerarse polimorfismo tiene que aparecer al menos en un 1% de la población, pudiendo afectar a un solo nucleótido o a secuencias cortas repetitivas de éstos. Por lo tanto, un polimorfismo podría considerarse una mutación estable que afecta de forma significativa a una población.

Las formas más frecuentes son los llamados “polimorfismos de un solo nucleótido” (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), siendo éstos los que originan la mayoría de diferencias genéticas entre los individuos. Existen aproximadamente 10 millones de polimorfismos en la especie humana. Si se trata de un SNP, normalmente serán 2 los posibles alelos en un locus: por ejemplo, el cambio de C por T (C>T). Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico (del 1 al 22), cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. Así, las 3 posibilidades de parejas de alelos o genotipos para el SNP del ejemplo serían TT, CT y CC. Los individuos con los 2 alelos idénticos son homocigotos y los que tienen diferentes alelos, heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

Aunque todos los SNP pueden ser importantes como marcadores genéticos, sólo una pequeña parte de ellos pueden originar alteraciones fenotípicas de las proteínas. Los más frecuentes son los que se encuentran en los intrones (secuencias no codificantes situadas entre los exones) de la región promotora del gen (secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para comenzar la transcripción). Menos frecuentes son los que se encuentran en la zona de codificación del gen, pero que no llegan a alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (SNP sinónimos o mutaciones silenciosas), siendo, por último, los más raros los que originan un cambio de un aminoácido de la proteína y por lo tanto alteraciones funcionales (SNP no sinónimos).

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus.

Los SNP que se encuentren en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el *splicing*, la unión de factores de transcripción o modificar la secuencia de ARN no codificante.

Se han asociado múltiples polimorfismos con la patogenia de los AI, muchos de los cuales implican vías relacionadas con mantenimiento endotelial vascular y la integridad de la matriz extracelular. Entre los más estudiados se encuentran la endotelina,

elastina o la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Con este contexto, en este trabajo se han seleccionado una serie de polimorfismos relacionados con el mantenimiento de la integridad endotelial del sistema vascular cerebral y potencialmente implicados en el desarrollo de AI.

POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los más potentes mitógenos de células endoteliales y desempeña un papel importante en la angiogénesis¹¹³. Promueve el crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes en procesos de inflamación crónica, cicatrización y en tumores. Además, la síntesis de esta citoquina es inducible por hipoxia y actúa como molécula señalizadora en el sistema nervioso central jugando un papel muy importante en la supervivencia, neuroprotección y regeneración neuronal.

El gen del VEGF está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, localización 6p21.1.

Tipos de VEGF en humanos:

- VEGF-A (que es la que se designa normalmente al hablar de VEGF): estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y su motilidad, iniciando la gemación de nuevos capilares. Además, funciona como quimiotáctico de macrófagos y granulocitos, participa en la creación de la luz y las fenestraciones de los vasos sanguíneos, produce vasodilatación indirecta (por liberación de NO) y aumenta la actividad de la metano monooxigenasa y de la integrina $\alpha\beta 3$.
- VEGF-B: Angiogénesis embrionaria.
- VEGF-C: Linfoangiogénesis.
- VEGF-D: Necesario para el desarrollo de la vasculatura linfática que rodea los bronquiolos.
- PlGF (factor de crecimiento placentario).

Los miembros de la familia VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca: VEGFR-1, VEGFR-2 (también denominado receptor de dominio quinasa/quinasa hepática fetal 1) y VEGFR-3,

localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares. El más importante en angiogénesis es VEGFR-2¹³⁸. El gen que lo codifica se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4, localización 4q12.

La unión de VEGF activa la fosforilación de residuos de tirosina específicos en el dominio intracelular de VEGFR2 permitiendo la activación de múltiples cascadas de señalización, que afectan a la angiogénesis, supervivencia, proliferación y migración endotelial. Por tanto, la disminución de la función de VEGFR2 puede jugar un papel crítico en el desarrollo de enfermedades vasculares. En los últimos años se han descrito diversos polimorfismos de los genes VEGFA y VEGFR2 y su relación con varias enfermedades cerebro-vasculares tales como la isquemia cerebral^{138, 148}, hemorragias cerebrales hipertensivas⁵² y el desarrollo de AI¹²⁶.

POLIMORFISMOS DEL GEN ENDOTELINA-1

La endotelina es un péptido considerado como el más potente vasoconstrictor conocido por el hombre, siendo incluso 10 veces más potente que la angiotensina II. Produce intensa constricción en el músculo liso vascular adyacente y contribuye con el mantenimiento endógeno del tono vascular.

Existen 3 isoformas:

- ET-1 producida en las células endoteliales vasculares.
- ET-2 en las células epiteliales renales y las células del estroma.
- ET-3 producida en las neuronas glía e intestino.

La ET-1 induce vasoconstricción, es proinflamatoria, profibrosis y tiene acción potencialmente mitógena. Es un importante factor en la regulación del tono vascular y participa en la remodelación vascular. Estos efectos son mediados a través de dos tipos de receptores, ETA y ETB. Los receptores ETA están localizados principalmente en el músculo liso vascular y son responsables de inducir la proliferación celular y vasoconstricción. Los receptores ETB están presentes en las células endoteliales y son mediadores de la relajación vascular por activación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina. Interviniendo, además en la depuración de la ET-1. El sistema endotelina está involucrado esencialmente con la hipertensión arterial sistémica, hipertensión

pulmonar, aterosclerosis, re-estenosis coronaria, fallo cardíaco, cardiomiopatías e insuficiencia renal ⁵.

Los factores que estimulan la síntesis de ET-1 son múltiples, pero la hipoxia e isquemia son los más importantes. En condiciones patológicas, como lo es una HSA, se incrementa la producción de ET-1, causando vasoconstricción, estrés oxidativo e inflamación, lo que supone un papel importante en el vasoespasmo ¹³.

Existen diversos trabajos que han analizado los polimorfismos de los genes responsables de la codificación de los receptores de endotelina (ENDRA, ENDRB y END1). En sus resultados, encontraron que existían polimorfismos concretos que se asociaban con la ruptura aneurismática y vasoespasmo clínico ⁴⁷, con el tamaño del aneurisma y la presencia de aneurismas múltiples ⁵³ y con un mayor riesgo de resangrado tras una HSAa ³⁸.

POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ENDOGLINA

La endoglina es una glucoproteína de membrana tipo I localizada en la superficie de la célula formando parte del complejo receptor del TGF- β . Se ha encontrado en células endoteliales, macrófagos activados, fibroblastos y células de músculo liso. Tiene un importante papel en el desarrollo del sistema cardiovascular, así como en la remodelación vascular. En experimentos llevados a cabo con ratones knockout que no poseen el gen de la endoglina se ha observado que mueren debido a anomalías cardiovasculares ¹¹⁹.

El gen que codifica la endoglina se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 9 ³⁵. En humanos, las mutaciones de este gen son las responsables de un trastorno vascular autosómico dominante que se denomina telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 1 ⁹⁰. Esta enfermedad se caracteriza por sangrados de nariz frecuentes, telangiectasia de la piel y las mucosas, pudiendo causar malformaciones arteriovenosas en diferentes órganos, incluyendo el cerebro, los pulmones y el hígado.

La endoglina resulta esencial para la señalización del TGF- β en las células endoteliales e interviene activamente en el proceso angiogénico al antagonizar el efecto inhibitorio del TGF- β 1 ⁷⁹. El nivel de expresión de la endoglina determina la capacidad de crecimiento de las células endoteliales. En ausencia de endoglina éstas no crecen y se desarrollan anomalías angiogénicas. Por el contrario, la sobreexpresión de endoglina

promueve la fase de activación de la angiogénesis ⁴⁴. Desempeña, además, un papel muy importante en la fibrogénesis, ya que se ha observado una sobreexpresión de esta proteína en biopsias de pacientes con fibrosis renal y hepática ¹¹⁴.

En cuanto a los AI, hay resultados contradictorios. Mientras en unos estudios no se ha encontrado relación entre polimorfismos determinados del gen de la endoglina y el desarrollo de AI ⁶⁵, en otros sí y se ha asociado con la presencia de AI y también con los casos de AI familiares ⁵⁶.

POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL (eNOS)

El óxido nítrico se sintetiza a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de NOS en el cerebro: la neuronal (nNOS o NOS1), la inducible (iNOS o NOS2) y la endotelial (eNOS o NOS3).

La eNOS es codificada por el gen NOS3, que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, localización 7q36.1. Su expresión es, principalmente, a nivel endotelial.

Su principal función es la síntesis de óxido nítrico, el vasodilatador endógeno más poderoso que se conoce y actúa mediante la activación de los canales de calcio. Además, es un regulador de la expresión de las células musculares lisas en los vasos sanguíneos, tiene un efecto antiagregante plaquetario y evita la adhesión leucocitaria local.

El NO ejerce un papel protector al activar la vía NO/cGMP, regulando el flujo sanguíneo cerebral por su acción vasodilatadora y produciendo efecto antiinflamatorio, antitrombótico y antiproliferativo. Como contraste, la pérdida de eNOS favorece la agregación plaquetaria, la proliferación de células de la musculatura vascular lisa, la adhesión leucocitaria al endotelio y el incremento de la tensión arterial. Sin embargo, el NO también puede ejercer efectos deletéreos cuando es producido en grandes cantidades, al activar la ruta NO/O₂-/ONOO⁻ que conlleva la muerte neuronal y disfunción del endotelio y la microvasculatura cerebral mediante estrés nitrosidativo ²⁶.

La importancia de esta enzima radica en que participa tanto en funciones hemodinámicas como estructurales y su ausencia o disminución podría provocar debilitamiento de la pared vascular o rotura, incidiendo en la susceptibilidad para la formación de aneurismas coronarios y cerebrales ⁴². Además, su acción es muy

importante en los casos de HSAa, ya que estaría relacionada con el vasoespasmo y la ICD⁶³.

Diversos estudios han analizado determinados polimorfismos de eNOS y su relación con el desarrollo de AI. Se ha encontrado relación con un mayor tamaño aneurismático⁶³, mayor riesgo de ruptura⁴², mayor gravedad en la hemorragia (grados 3 y 4 de Fisher), mayor riesgo de desarrollo de vasoespasmo y, por lo tanto, peor pronóstico neurológico^{68, 70, 122, 123}.

HIPÓTESIS

Dado que el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), su receptor 2 (VEGFR2), la Endotelina-1, la Endogлина y la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se encuentran relacionados con el proceso de degeneración de la pared vascular, las variantes genéticas de estas proteínas deberían influir en el desarrollo de aneurismas cerebrales y su evolución clínica.

OBJETIVOS

Objetivo principal

1. Determinar la relación entre los aneurismas cerebrales y la hemorragia subaracnoidea aneurismática con los polimorfismos rs833061 del gen VEGFA, rs2071559 del gen VEGFR2, rs5370 del gen de la Endotelina-1, rs3739817 del gen de la Endogлина y rs1799983 del gen eNOS y comparar estos resultados con la muestra de sujetos sanos.

Objetivos secundarios

1. Correlacionar los resultados obtenidos con el desarrollo de vasoespasmo, tras la ruptura aneurismática.
2. Correlacionar los resultados obtenidos con el pronóstico vital y funcional.
3. Analizar la relación entre la aparición de hidrocefalia y vasoespasmo con variables clínicas intrínsecas del paciente y otras propias de la hemorragia subaracnoidea.

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

Se trata de un estudio prospectivo de casos y controles, evaluado y aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (CINV 15-64), de acuerdo con las leyes locales (LO 15/1999 Y RD 1720/2007). Se incluyeron 176 pacientes diagnosticados con AI en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Clínico Universitario de Valladolid entre los años 2015 y 2019.

Como grupo control, se incluyeron 150 sujetos sanos, mayores de 40 años, sin patologías médicas conocidas, del mismo área geográfica y características poblacionales, seleccionados al azar del Banco de Sangre.

En el grupo control no se realizaron estudios invasivos para descartar la presencia de AI (como la angiografía cerebral), por razones éticas. Sin embargo, quedaron excluidos del estudio los individuos fumadores y los diagnosticados de hipertensión arterial o con antecedentes familiares de AI. En el análisis de los datos se incluyó el factor de error asumible a la prevalencia de esta patología en la población general.

Como criterios de inclusión, se tuvieron en cuenta haber cumplido la mayoría de edad y tener confirmado el diagnóstico mediante angiografía cerebral de alguno o varios aneurismas cerebrales, tanto rotos como incidentales. La colaboración de los pacientes fue voluntaria y consistió en una extracción de sangre periférica para su análisis genético y un cuestionario sobre datos epidemiológicos, hábitos, cuadro clínico y características propias del aneurisma.

Como criterio de exclusión se tuvo en cuenta la negativa del paciente a formar parte del estudio, dificultades técnicas en el procesamiento y análisis genético de la muestra y la ausencia de pruebas diagnósticas necesarias para estudiar y categorizar la HSAa y/o el AI.

Las muestras se recogieron, previa firma de consentimiento informado para su inclusión en el estudio, durante su hospitalización en nuestro centro. Se extrajeron 10 ml de sangre periférica de cada individuo mediante venopunción. Dichas muestras se conservaron en tubos con EDTA como anticoagulante y fueron anonimizadas y enviadas a la Unidad de Medicina Molecular, perteneciente al Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca. Allí se almacenaron a -20°C hasta su determinación analítica.

Las variables analizadas, fueron:

- 1) Características epidemiológicas de los pacientes: sexo, edad al diagnóstico, factores de riesgo de AI (hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, diabetes mellitus y dislipemia) y antecedentes familiares.
- 2) Características del aneurisma: localización, número de aneurismas y tamaño.
- 3) Presentación clínica: estado al diagnóstico (roto / no roto), estado clínico al diagnóstico (puntuación escala de Hunt y Hess), gravedad de la hemorragia (puntuación en la escala de Fisher) y presencia de hidrocefalia y vasoespasmos.
- 4) Manejo clínico: tratamiento recibido.
- 5) Pronóstico vital y funcional: puntuación en la escala GOSE, considerando la muerte (grado 1), discapacidad severa (grados 2, 3 y 4), discapacidad moderada (grados 5 y 6) y una buena recuperación (grados 7 y 8).

En los casos con AI familiares sólo se incluyó un paciente afectado de cada familia.

MÉTODOS

SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

La selección se centró en los genes VEGFA, VEGFR2, endotelina, endoglina y eNOS porque codifican proteínas implicadas en el mantenimiento endotelial e integridad de la matriz extracelular del sistema vascular cerebral.

Inicialmente, seleccionamos aquellos polimorfismos con una frecuencia poblacional del alelo menor superior a 10% en población caucásica y ubicados en secuencias muy conservadas a lo largo de la evolución. Este fue el caso de endotelina rs5370, endoglina rs3739817 y eNOS rs1799983.

En el caso de los polimorfismos VEGFA rs833061 y VEGFR2 rs2071559, son consecuencia de una mutación intrónica o no codificante, pero los seleccionamos por su relevancia según publicaciones previas. La frecuencia del alelo menor en caucásicos era superior al 10%, y ambos SNP implicaban cambios en los sitios de reconocimiento de factores de transcripción (Tabla 3).

Tabla 3. Polimorfismos analizados en el estudio. ^aHWE: equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control.

Gen	SNP	Identificación	Cambio	Cambio de aminoácido	HWE ^a
VEGFA	rs833061	c_1647381_10	T>C	-	>0,05
VEGFR2	rs2071559	c_15869271_10	T>C	-	>0,05
Endotelina-1	rs5370	c_598677_1	G>T	K197N	>0,05
Endogлина	rs3739817	c_27491008_10	C>T	T343T	>0,05
eNOS	rs1799983	c_3219460_20	G>T	E298D	>0,05

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN

Una vez descongeladas las muestras, se obtuvo el ADN para su posterior estudio mediante el siguiente procedimiento:

Las células nucleadas de la sangre se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50mL de agua bidestilada -ddH₂O- durante 30 minutos, a 4°C y a 1500 rpm). Tras la recuperación de la interfase creada y lisis de los hematíes con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50mM Tris-HCl pH: 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl₂) y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos.

El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de 5x10⁶ células/mL, tras lo cual se añadió EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético, concentración final 10 mM), SDS (dodecil sulfato sódico, concentración final 1%) y Proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/mL). La mezcla se incubó a 55 °C durante 8-16 horas 408, tras la cual se procedió a purificar el ADN con fenol y cloroformo.

La muestra de ADN, con una concentración aproximada entre 1,000 y 1,500µg/mL, se almacenó en tubos eppendorf a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS

Los estudios de discriminación alélica se realizan fundamentalmente mediante dos métodos: el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qQRT-PCR). En nuestro estudio la técnica utilizada fue la segunda.

Esta técnica sigue el mismo procedimiento de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional, pero la amplificación tiene lugar en presencia de unos componentes capaces de emitir fluorescencia, lo que permite conocer y registrar la cinética de la amplificación en todo momento. Para ello se emplean sondas que emiten fluorescencia al hibridar con la secuencia complementaria. En este caso, se han empleado sondas TaqMan®, marcadas con los fluorocromos VIC y FAM, uno para cada alelo de los genes estudiados. Estas sondas, complementarias para una secuencia específica, presentan un donador en el extremo 5' y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador cuando los extremos de la sonda están próximos, lo que sucede mientras la sonda está intacta.

Durante el anillamiento, tanto los oligonucleótidos como las sondas fluorescentes se unen a las cadenas de ADN. Taq polimerasa tiene además actividad 5'-3' exonucleasa, de modo que si mientras realiza la extensión de una molécula de ADN a partir de un *primer* encuentra una sonda unida a esa cadena, la hidroliza. Al separarse el fluorocromo y el aceptor, la fluorescencia ya no es absorbida, de modo que la fluorescencia liberada tras la excitación de la muestra con un láser es detectada por el lector (Fig 11).

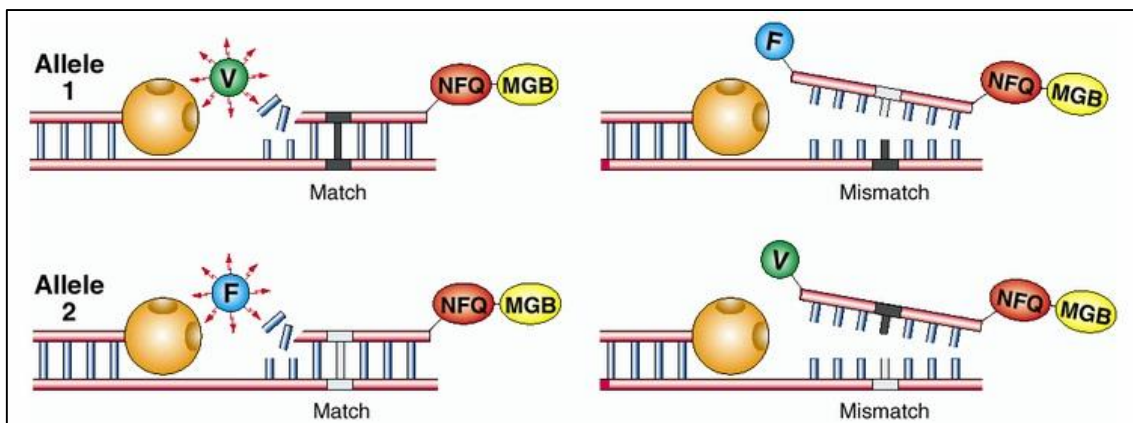


Figura 11. Mecanismo de la PCR con sondas Taqman®. Mientras la Taq polimerasa (naranja) copia el ADN, hidroliza las sondas que se encuentra en el proceso, separando el fluorocromo (V Y F) del aceptor. De este modo, la fluorescencia liberada tras la excitación de la muestra con un láser es detectada por un lector.

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida.

Nuestro estudio se realizó en un termociclador StepOne de Applied Biosystems® que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados.

Para evaluar la reproducibilidad se realizó una selección aleatoria del 5% de las muestras, que fueron reagentipadas. Todos estos genotipos coincidieron con los genotipos inicialmente designados.

Técnica de genotipado

Las reacciones de PCR se realizaron con 5 µl de los productos comerciales para QRT-PCR *TaqMan® Universal PCR Master Mix* y *TaqMan® Genotyping Mastermix®* (Applied Biosystem, Foster City, CA). Se añadió 0.5 µl del preparado comercial *TaqMan® SNP Genotyping Assays*, que contiene los *primers* con las sondas y 0.5 µl de ADN y 4.25 µl de H₂O, para un volumen final de 10 µl.

Se emplearon placas de 96 pocillos en las que, a modo de control de una posible contaminación, se incluyeron preparaciones que contenían todos los reactivos citados, excepto los ADN problema.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	60 °C	30 segundos	Desnaturalización
40	95 °C	10 minutos	Desnaturalización
	95 °C	15 segundos	Anillamiento
	60 °C	1 minuto	Extensión
1	60 °C	30 segundos	Extensión

La lectura de fluorescencia se realizó antes y después de la amplificación mediante el sistema *StepOne®* (Applied Biosystem, Foster City, CA) utilizando el software *Allelic*

Discrimination Program (Applied Biosystem, Foster City, CA) para la determinación del alelo presente en cada una de las muestras.

A modo de ejemplo, en la Fig. 12 se muestra la representación gráfica de la detección de fluorescencia para el polimorfismo rs1799983 eNOS G>T. Cada uno de los puntos representa una muestra estudiada. En el caso de los individuos T/T, solo se une la sonda marcada con FAM (representado en azul); en el caso de los individuos G/G, solo se une la sonda marcada con VIC (rojo); y el sistema representa en verde los genotipos G/T en el que se unen ambas sondas. Los cuadrados negros representan las muestras sin ADN que se emplean como control.

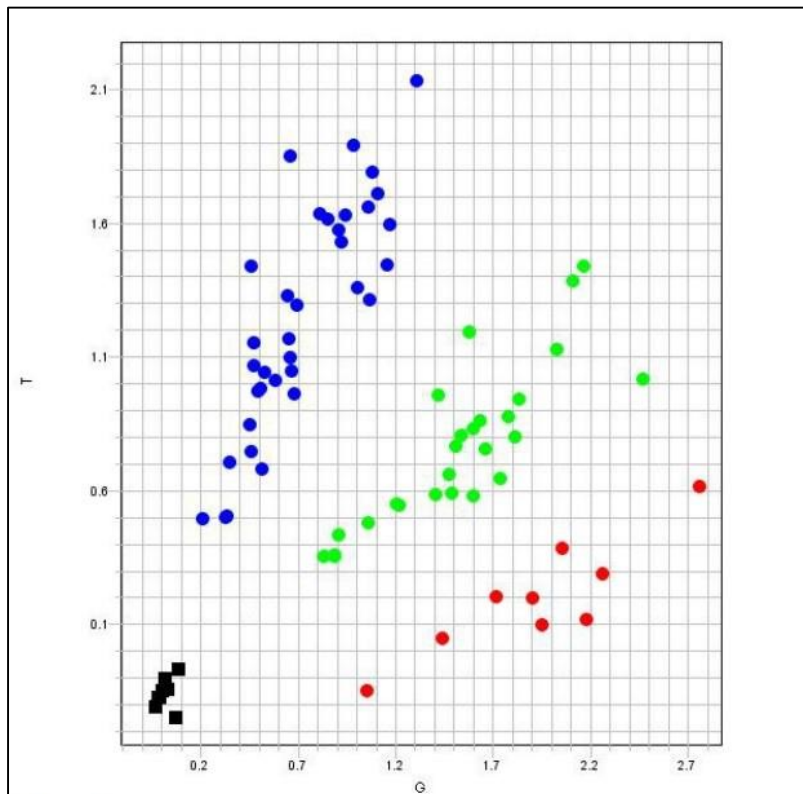


Figura 12. Discriminación alélica del SNP rs1799983 eNOS G>T (*Allelic Discrimination Programme*, Applied Biosystem).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comprobar la representatividad de la muestra objeto de estudio respecto de la población general (grupo control), y comprobar que no estuviera sesgada por una distribución estratificada de las variantes polimórficas debidas a un apareamiento no aleatorio, se calculó si la distribución genotípica para todos los polimorfismos y todos los grupos se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, comparando los valores obtenidos con los esperados mediante el test de χ^2 .

Para todos los polimorfismos se estudiaron las variantes genéticas entre pacientes con aneurismas intracraneales frente a controles. También analizamos las diferentes variantes genéticas de los polimorfismos estudiados y su relación con la presentación clínica (riesgo de ruptura) y su evolución (presentación de vasoespasmos y pronóstico vital y funcional).

Se estimaron los odds ratio (OR) y los intervalos de confianza del 95% para cada polimorfismo mediante un análisis multivariante, usando modelos de regresión logística incondicional. Los valores de p fueron ajustados por sexo y edad al diagnóstico.

El análisis se realizó utilizando el programa SPSS Statistic® (versión 21 SPSS Inc, Chicago, IL, Estados Unidos) considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

También es posible analizar este tipo de datos, asumiendo un modelo genético preestablecido. Existen los siguientes:

a) Modelo dominante. Se hace la suposición de que portar un determinado alelo incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Por ejemplo, se supone que una única copia de A es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos AB y homocigotos AA tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos BB.

b) Modelo recesivo. Se hace la suposición de que portar dos copias de un alelo incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Por ejemplo, se supone que son necesarias 2 copias de A para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos AB y homocigotos BB tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos AA.

c) Modelo codominante. Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del genotipo más frecuente.

No es fácil hallar un criterio para establecer el modelo de herencia más adecuado para un polimorfismo concreto. Por ello, comparamos el ajuste del modelo codominante, que es el más general (2 parámetros), con los demás modelos (1 parámetro). Estas comparaciones se realizaron mediante el test de la razón de verosimilitudes. También se calcularon las OR de asociación entre cada genotipo y la enfermedad y los correspondientes intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Se incluyeron un total de 176 pacientes con diagnóstico de AI en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid entre los años 2015 y 2019 y 150 sujetos sanos como controles.

La edad media de los pacientes cuando fueron diagnosticados de aneurismas fue de 58 ± 13 años, el 43.2 % de los pacientes eran varones y el 56.8 % mujeres. En cuanto a la distribución de los factores de riesgo analizados, el 69.9% tenían hipertensión (HTA), el 9.7 % diabetes mellitus (DM tipo 2), el 38.1 % dislipemia, el 40.9 % consumían tabaco y el 25% alcohol. Además, el 2.3 % de los pacientes tenían antecedentes familiares de AI (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas de la muestra en cuanto a los factores de riesgo de AI.

Factores de riesgo de AI	Resultado (n, %)
Hipertensión	123 (69.9%)
Consumo de tabaco	72 (40.9%)
Consumo de alcohol	44 (25%)
Diabetes mellitus	17 (9.7%)
Dislipemia	67 (38.1%)
Antecedentes familiares	4 (2.3%)

Respecto a la forma de presentación clínica de los AI cuando fueron diagnosticados, en la mayoría de los casos (65.9%) fue en forma de ruptura aneurismática (HSAa), un 27.8% como aneurismas incidentales (no rotos) y el 6.3% en forma de cefalea centinela.

El número medio de AI presentados por paciente fue de 1.27 ± 0.63 . 143 pacientes (81.25%) presentaron un único aneurisma. 21 pacientes (11.93%), dos aneurismas. 9 pacientes (5.11%) 3 aneurismas y 3 pacientes (2.27%) 4 aneurismas.

En relación a la localización, la mayoría estuvieron localizados en circulación anterior (88.6%). Por orden de frecuencia se situaron en: arteria comunicante anterior 33%, arteria carótida interna 18.8%, arteria cerebral media 17.6%, arteria comunicante posterior 14.8% y en mucha menor frecuencia, arterias cerebral anterior, pericallosa, oftálmica y coroidea con un 4.4%. En cuanto a los AI localizados en la circulación posterior (11.4%), la localización más frecuente fue la arteria basilar con un 6.8% sobre

el total, seguida de la arteria cerebelosa postero-inferior (PICA) con un 2.8% y la arteria vertebral con un 1.7%.

En referencia al tamaño de los AI, la mayoría (86.9%) fueron pequeños y medianos, el 8% microaneurismas, 2.8% aneurismas grandes y el 2.3% aneurismas gigantes (Tabla 5).

Tabla 5. Características clínicas de la muestra en cuanto a presentación clínica, localización y tamaño del aneurisma.

Presentación clínica	Resultado (n, %)
HSAa	116 (65.9%)
Cefalea centinela	11 (6.3%)
Incidental	49 (27.8%)
Localización del aneurisma	Resultado (n, %)
Circulación anterior	156 (88.6%)
Arteria comunicante anterior	58 (33%)
Arteria carótida interna	33 (18.8%)
Arteria cerebral media	31 (17.6%)
Arteria comunicante posterior	26 (14.8%)
Otras (cerebral anterior, pericallosa, coroidea, oftálmica)	8 (4.4%)
Circulación posterior	20 (11.4%)
Arteria basilar	12 (6.8%)
Arteria cerebelosa postero-inferior (PICA)	5 (2.8%)
Arteria vertebral	3 (1.7%)
Tamaño del aneurisma	Resultado (n, %)
Micro-aneurismas (<3mm)	14 (8%)
Pequeños-medianos (3.1-11mm)	153 (86.9%)
Grandes (11.1-25mm)	5 (2.8%)
Gigantes (>25mm)	4 (2.3%)

Entre los casos que se presentaron en forma de ruptura, el 67.6% lo hizo en forma de hemorragia profusa (grado 4 escala Fisher), el 25% con hemorragias de grado 3 y el 7.4% con hemorragias de grado 2.

En cuanto al estado clínico de los pacientes con AI rotos en el momento del diagnóstico: el 35.2% se encontraban asintomáticos o con cefalea como único síntoma (Grado I escala Hunt y Hess), 34.7% de los pacientes presentaban déficits neurológicos focales, cefalea severa, rigidez nuchal, letargia o confusión (Grados II y III escala Hunt y

Hess) y un 30.1% presentaban déficits neurológicos graves o estado de coma (Grados IV y V de la escala Hunt y Hess).

Respecto al tratamiento recibido, la mayoría se trató mediante embolización (53.4% coils, 17% stent), el 19.3% mediante cirugía (clipaje microquirúrgico) y el 10.2% no recibió tratamiento alguno. Los motivos de no haber recibido tratamiento fueron: mal estado clínico del paciente con un fallecimiento precoz, resanrados y negativa del propio paciente.

Dentro del grupo de pacientes con aneurismas rotos, es decir con HSAa, un 64.6% presentó hidrocefalia, con la consecuente necesidad de ser colocado un drenaje ventricular externo para el tratamiento de la misma. Un 18.1% de presentó vasoespasma durante las 3 semanas siguientes a la hemorragia, frente a un 81.9% que no lo presentó.

Por último, fue analizada la evolución clínica de los pacientes 6 meses tras el diagnóstico mediante la escala GOSE. El 57.4% presentó una buena recuperación con déficits psicológicos o neurológicos menores (grados 7 y 8), el 18.8% presentó una discapacidad moderada (grados 5 y 6), el 13.06% discapacidad severa, siendo dependientes para sus actividades de la vida diaria (grados 2, 3 y 4) y el 11.4% falleció (grado 1), como puede observarse en la Tabla 6.

Los datos del análisis de cada una de las variables clínicas de los pacientes estudiados se encuentran reflejados en los Anexos I y II.

Tabla 6. Características clínicas de la muestra en cuanto a volumen de la hemorragia, estado clínico al diagnóstico, tratamiento recibido, desarrollo de hidrocefalia, vasoespasma y pronóstico. *Porcentaje respecto de los aneurismas rotos (n=116).

Volumen de la hemorragia (Escala de Fisher)	Resultado (n, %)
Grado 1	0 (0%)
Grado 2	13 (7.38%)
Grado 3	44 (25%)
Grado 4	119 (67.61%)
Estado clínico al diagnóstico (Escala Hunt y Hess)	Resultado (n, %)
Grado I	62 (35.22%)
Grado II	50 (28.4%)
Grado III	11 (6.25%)
Grado IV	13 (7.38%)
Grado V	40 (22.72%)

Tratamiento recibido	Resultado (n, %)
Coils	94 (53.4%)
Stent	30 (17%)
Clipaje microquirúrgico	34 (19.3%)
Ninguno	18 (10.2%)
Desarrollo de vasoespasmo	Resultado (n, %)
Si	21 (18.1%*)
No	95 (81.9%*)
Desarrollo de hidrocefalia aguda (necesidad de DVE)	Resultado (n, %)
Si	75 (64.6%*)
No	41 (35.4%*)
Pronóstico (escala GOSE)	Resultado (n, %)
Muerte (grado 1)	20 (11.4%)
Discapacidad severa (grados 2, 3 y 4)	23 (13.06%)
Discapacidad moderada (grados 5 y 6)	32 (18.8%)
Buena recuperación (grados 7 y 8)	101 (57.4%)

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS

Dentro de las variables analizadas en este estudio, las de principal relevancia clínica en el curso clínico de una HSAa son el desarrollo de dos de las complicaciones más frecuentes: hidrocefalia y vasoespasmo.

En ellas nos hemos centrado para hacer un análisis pormenorizado sobre qué factores no genéticos pueden estar relacionados con la aparición estas dos complicaciones en la evolución clínica de los pacientes con aneurismas rotos.

1. HIDROCEFALIA

Dentro del grupo de pacientes con HSAa (n= 116), analizamos la relación de diferentes variables clínicas con el desarrollo de hidrocefalia (n=75).

En relación con las características intrínsecas del paciente, ni el sexo (p= 0.182), edad (p=0.549), hipertensión (p=0.293), tabaquismo (p=0.486), consumo de alcohol (p=0.105) o diabetes (p=0.168) tuvieron relación significativa con el desarrollo de hidrocefalia por parte de estos pacientes.

En cuanto a las características intrínsecas del aneurisma, la localización de los AI rotos no tuvo relación significativa con el desarrollo de hidrocefalia ($p=0.779$). Tampoco el tratamiento recibido ($p=0.704$).

Sin embargo, la presencia de hemorragia intraventricular (grado 4 en la Escala de Fisher) y un peor estado clínico al diagnóstico (Hunt y Hess) sí tuvieron una relación significativa con el desarrollo de hidrocefalia, multiplicando el riesgo hasta por 3, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Distribución del desarrollo de hidrocefalia en relación con la presencia inicial de hemorragia intraventricular (grado 4 en la escala de Fisher) y la situación neurológica del paciente al diagnóstico de HSAa.

	Hidrocefalia	No hidrocefalia	p	OR
Hemorragia intraventricular				
Fisher 1, 2 y 3	67(58.6%)	9 (7.7%)	0.004	3.1 (2.5-3.6)
Fisher 4	8 (6.8%)	32 (26.7%)		
Hunt y Hess				
Grados I y II (síntomas leves)	44 (34.9%)	31 (26.7%)	0.001	3.8 (2.6-4.2)
Grado III (síntomas moderados)	5 (4.3%)	8 (6.9%)		
Grados IV y V (síntomas graves)	26 (22.4%)	2 (1.7%)		

2. VASOESPASMO

En cuanto al vasoespasmio, analizamos la relación de diferentes variables clínicas con el desarrollo del mismo ($n=21$) dentro del grupo de pacientes con HSAa ($n= 116$).

En relación con las características intrínsecas del paciente, ni el sexo ($p= 0.253$), edad ($p=0.521$), hipertensión ($p=0.283$), tabaquismo ($p=0.435$), consumo de alcohol ($p=0.245$) o diabetes ($p=0.287$) tuvieron relación significativa con el desarrollo de vasoespasmio.

En cuanto a las características intrínsecas del aneurisma, la localización de los AI rotos no tuvo relación significativa con el desarrollo de vasoespasmio ($p=0.559$). Tampoco el estado neurológico inicial (escala de Hunt y Hess) ($p=0.233$), ni el tratamiento recibido ($p=0.424$).

Sin embargo, el volumen de la hemorragia (puntuación mayor en la Escala de Fisher) sí tuvo relación significativa con el desarrollo de vasoespasmio ($p=0.02$), siendo el riesgo de presentarlo más del doble en el caso de los grados 3 y 4 (OR 2.2). Por otro lado,

analizando el pronóstico de estos pacientes, encontramos relación significativa entre la presencia de vasoespasmo y un peor pronóstico vital y funcional ($p=0.03$), multiplicando casi al doble el riesgo de presentar secuelas en el futuro y/o fallecer (OR 1.9), como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Distribución del desarrollo de hidrocefalia en relación con la presencia inicial de hemorragia intraventricular (grado 4 en la escala de Fisher) y la situación neurológica del paciente al diagnóstico de HSAa.

	Vasoespasmo	No vasoesp	p	OR
Escala de Fisher				
Grado 1	0 (0%)	36 (31%)		
Grado 2	2 (1.7%)	29 (25%)		
Grado 3	8 (6.89%)	22 (18.9%)	0.02	2.2
Grado 4	11 (9.48%)	8 (6.89%)		(1.7-2.5)
Pronóstico (escala GOSE)				
Grado 1 (Muerte)	7 (6.03%)	6 (5.17%)		
Grados 2-6 (Recuperación con secuelas)	9 (7.75%)	35 (30.2%)	0.03	1.9
Grados 7 y 8 (Recuperación sin secuelas)	5 (4.31%)	55 (47.4%)		(1.5-2.3)

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS

Una vez comprobada la representatividad de la muestra mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg, analizamos la posible relación existente entre distintos polimorfismos de los genes VEGFA, VEGFR2, Endotelina, Endogлина y eNOS y la presencia de aneurismas cerebrales, realizando un estudio comparativo entre los sujetos sanos (grupo control) y los sujetos con AI. Dentro del grupo de pacientes con aneurismas, también analizamos la posible relación existente entre las variantes genéticas que se pretende estudiar y el riesgo de ruptura, la aparición de vasoespasmo y la evolución clínica.

Los resultados observados para cada gen se exponen a continuación de forma individualizada mediante una tabla de distribución genotípica y otra de frecuencias alélicas. Además, los que han resultado estadísticamente significativos se representan en las tablas de frecuencia.

Los datos del análisis de cada uno de los polimorfismos de las muestras de los pacientes estudiados se encuentran reflejados en los Anexos III y IV.

POLIMORFISMO rs833061 DEL GEN VEGFA

Los resultados del análisis del polimorfismo rs833061 del gen del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) se muestran en las Tablas 9 y 10.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ni frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente –el alelo C– como referencia, tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0,05$). Por lo tanto, no hay evidencias de que portar el alelo C o el genotipo CC modifiquen el riesgo de presentar aneurismas.

Así mismo, dentro del grupo de pacientes con AI tampoco se encontraron diferencias significativas entre la distribución genotípica y la presentación clínica (riesgo de ruptura) ($p = 0.49$), el desarrollo de vasoespasmos ($p = 0.95$) y pronóstico vital y funcional ($p = 0.24$).

Tabla 9. Distribución genotípica del SNP rs833061 del gen VEGFA entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Genotipo	Controles	Casos	p
VEGFA rs833061	TT	41 (27,3%)	41 (23,3%)	0,473
	TC	69 (46,0%)	93 (52,8%)	
	CC	40 (26,7%)	42 (23,9%)	
	TT	41 (27,3%)	41 (23,3%)	0,443
	TC+CC	109 (72,7%)	135 (76,7%)	
	TT+TC	110 (73,3%)	134 (76,1%)	0,561
	CC	40 (26,7%)	42 (23,9%)	

Tabla 10. Frecuencias alélicas del SNP rs833061 del gen VEGFA entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Alelo	Controles	Casos	p
VEGFA rs833061	T	151 (50.3%)	175 (49.7%)	0.875
	C	149 (49.7%)	177 (50.3%)	

POLIMORFISMO rs2071559 DEL GEN VEGFR2

Los resultados del análisis del polimorfismo rs2071559 del gen del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) se muestran en las Tablas 11 y 12.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ni frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente –el alelo C– como referencia, tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0,05$). Por lo tanto, no hay evidencias de que portar el alelo C o el genotipo CC modifiquen el riesgo de presentar aneurismas.

De igual modo, dentro del grupo de pacientes con AI tampoco se encontraron diferencias significativas entre la distribución genotípica y la presentación clínica (riesgo de ruptura) ($p = 0,72$), el desarrollo de vasoespasmos ($p = 0,98$) y pronóstico vital y funcional ($p = 0,37$).

Tabla 11. Distribución genotípica del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Genotipo	Controles	Casos	p
VEGFR2 rs2071559	TT	38 (25,3%)	36 (20,5%)	0,462
	TC	82 (54,7%)	97 (55,1%)	
	CC	30 (20,0%)	43 (24,4%)	
	TT	38 (25,3%)	36 (20,5%)	0,353
	TC+CC	112 (74,7%)	140 (79,5%)	
	TT+TC	120 (80,0%)	133 (75,6%)	0,339
	CC	30 (20,0%)	43 (24,4%)	

Tabla 12. Frecuencias alélicas del SNP rs2071559 del gen VEGFR2 entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Alelo	Controles	Casos	p
VEGFR2 rs2071559	T	158 (52.7%)	169 (48%)	0.236
	C	142 (47.3%)	183 (52%)	

POLIMORFISMO rs5370 DEL GEN DE LA ENDOTELINA

Los resultados del análisis del polimorfismo rs5370 del gen de la endotelina se muestran en las Tablas 13 y 14.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ni frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente –el alelo G– como referencia, tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0,05$). Por lo tanto, no hay evidencias de que portar el alelo G o el genotipo GG modifiquen el riesgo de presentar aneurismas.

De igual forma, dentro del grupo de pacientes con AI tampoco se encontraron diferencias significativas entre la distribución genotípica y la presentación clínica (riesgo de ruptura) ($p = 0,7$), el desarrollo de vasoespasmo ($p = 0,35$) y pronóstico vital y funcional ($p = 0,52$).

Tabla 13. Distribución genotípica del SNP rs5370 del gen de la endotelina entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Genotipo	Controles	Casos	p
Endotelina rs5370	GG	80 (53,3%)	107 (60,8%)	0,266
	GT	57 (38,0%)	60 (34,1 %)	
	TT	13 (8,7%)	9 (5,1%)	
	GG	80 (53,3%)	107 (60,8%)	0,175
	GT+TT	70 (46,7%)	69 (39,2%)	
	GG+GT	137 (91,3%)	167 (94,9%)	0,202
	TT	13 (8,7%)	9 (5,1%)	

Tabla 14. Frecuencias alélicas del SNP rs5370 del gen de la endotelina entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Alelo	Controles	Casos	p
Endotelina rs5370	G	217 (72.3%)	274 (77.8%)	0.104
	T	83 (27.7%)	78 (22.2%)	

POLIMORFISMO rs3739817 DEL GEN DE LA ENDOGLINA

Los resultados del análisis del polimorfismo rs3739817 del gen de la endogлина se muestran en las Tablas 15 y 16.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ni frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente –el alelo C– como referencia, tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0,05$). Por lo tanto, no hay evidencias de que portar el alelo C o el genotipo CC modifiquen el riesgo de presentar aneurismas.

Tabla 15. Distribución genotípica del SNP rs3739817 del gen de la endogлина entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Genotipo	Controles	Casos	p
Endogлина rs3739817	CC	134 (89,3%)	151 (85,8%)	0,337
	CT	16 (10,7%)	25 (14,2 %)	
	TT	0 (0%)	0 (0%)	
	CC	134 (89,3%)	151 (85,8%)	0,337
	CT+TT	16 (10,7%)	25 (14,2 %)	
	CC+CT	150 (100%)	176 (100%)	>0,05
	TT	0 (0%)	0 (0%)	

Tabla 16. Frecuencias alélicas del SNP rs3739817 del gen de la endogлина entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Alelo	Controles	Casos	p
Endogлина rs3739817	C	284 (94.7%)	327 (92.9%)	0.354
	T	16 (5.3%)	25 (7.1%)	

Así mismo, dentro del grupo de pacientes con AI no se encontraron diferencias significativas entre la distribución genotípica y el riesgo de ruptura ($p=0.16$) ni el pronóstico vital y funcional ($p=0.44$).

Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre la distribución genotípica de este gen y el desarrollo de vasoespasmo ($p < 0.05$), tal y como se muestra en la Tabla 17 y Fig 13. Ser heterocigoto para este gen, aumenta el riesgo de presentar vasoespasmo.

Tabla 17. Distribución genotípica del SNP rs3739817 del gen de la endoglina entre el grupo de pacientes con y sin vasoespasmo.

SNP	Genotipo	No Vasoespasmo	Vasoespasmo	p
Endoglina rs3739817	CC	22 (23.2%)	0 (0%)	0,049
	CT	73 (76.8%)	21 (100%)	
	TT	0 (0%)	0 (0%)	

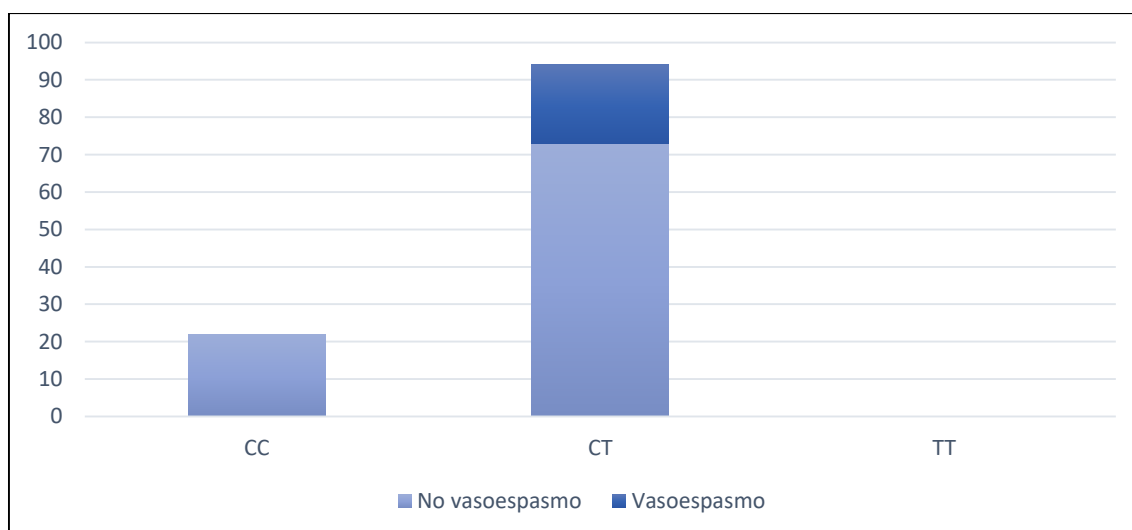


Figura 13. Diagrama de barras que refleja la distribución genotípica del SNP rs3739817 del gen de la endoglina entre el grupo de pacientes con y sin vasoespasmo.

POLIMORFISMO rs1799983 DEL GEN DE LA ENZIMA eNOS

El polimorfismo rs1799983 corresponde al cambio G894T en el exón 7 de eNOS, y codifica un cambio de aminoácido Glu > Asp en la posición 298.

Los resultados del análisis del polimorfismo rs1799983 del gen de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se muestran en las Tablas 18 y 19.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en distribución genotípica para el polimorfismo eNOS rs1799983 entre pacientes con AI y sujetos sanos. Se ha podido observar que el alelo G es más frecuente en pacientes con aneurismas

(64.2% versus 56.3%) y el T lo es en controles (43.7% versus 35.8%), lo que puede interpretarse como que el hecho de ser portador del alelo G constituye un factor de riesgo para la presencia de aneurismas, mientras que en sentido contrario el alelo T puede actuar con un factor protector frente al desarrollo de AI (Fig 15).

Además, en el grupo de pacientes con aneurismas se observa una mayor proporción de genotipo GG (40.9% versus 36.7%) y en el grupo de controles, una mayor proporción de genotipo TT (24% versus 12.5%), alcanzando significación estadística ($p=0,01$) (Fig 14).

Al realizar un análisis de regresión logística, la presencia del genotipo homocigoto TT disminuye a menos de la mitad (OR 0.46) las probabilidades de presentar aneurismas cerebrales ($p=0,019$).

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución alélica del polimorfismo eNOS rs1799983. Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo T del polimorfismo eNOS rs1799983 tienen disminuido el riesgo de padecer aneurismas, y que ello sucede independientemente de la edad y del género. De este modo, ser portador del alelo G se asoció con un mayor riesgo de desarrollar AI.

Por otro lado, dentro del grupo de pacientes con AI no se encontraron diferencias significativas entre la distribución genotípica y la presentación clínica (riesgo de ruptura) ($p=0.28$), el desarrollo de vasoespasmos ($p=0.23$) y pronóstico vital y funcional ($p=0.14$).

Tabla 18. Distribución genotípica del SNP rs1799983 del gen de la enzima eNOS entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Genotipo	Controles	Casos	p	OR (95% CI)
eNOS rs1799983	GG	55 (36,7%)	72 (40,9%)	/	1.00
	GT	59 (39,3%)	82 (46,6%)	0,809	1.06 (0.65-1.72)
	TT	36 (24,0%)	22 (12,5%)	0,019	0.46 (0.24-0.88)
	GG	55 (36,7%)	72 (40,9%)	0,494	
	GT+TT	95 (63,3%)	104 (59,1%)		
	GG+GT	114 (76,0%)	154 (87,5%)	/	1.00
	TT	36 (24,0%)	22 (12,5%)	0,008	0.42 (0.25-0.81)

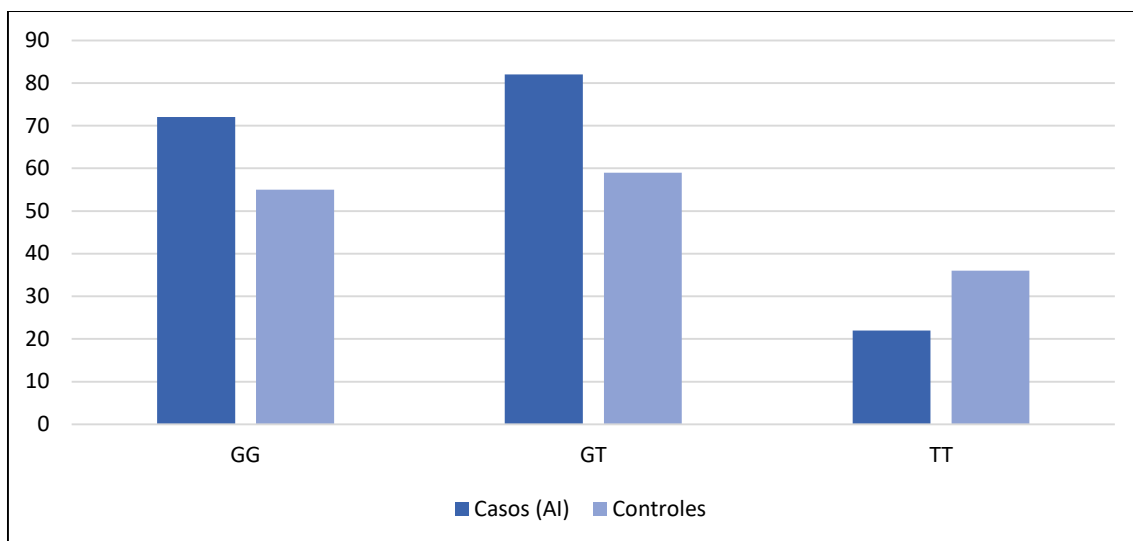


Figura 14. Diagrama de barras que refleja la distribución genotípica del SNP rs1799983 del gen de la enzima eNOS entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

Tabla 19. Frecuencias alélicas del SNP rs1799983 del gen de la enzima eNOS entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

SNP	Alelo	Controles	Casos	p	OR (95% CI)
eNOS rs1799983	G	169 (56.3%)	226 (64.2%)	/	1.00
	T	131 (43.7%)	126 (35.8%)	0.004	0.71 (0.52-0.98)

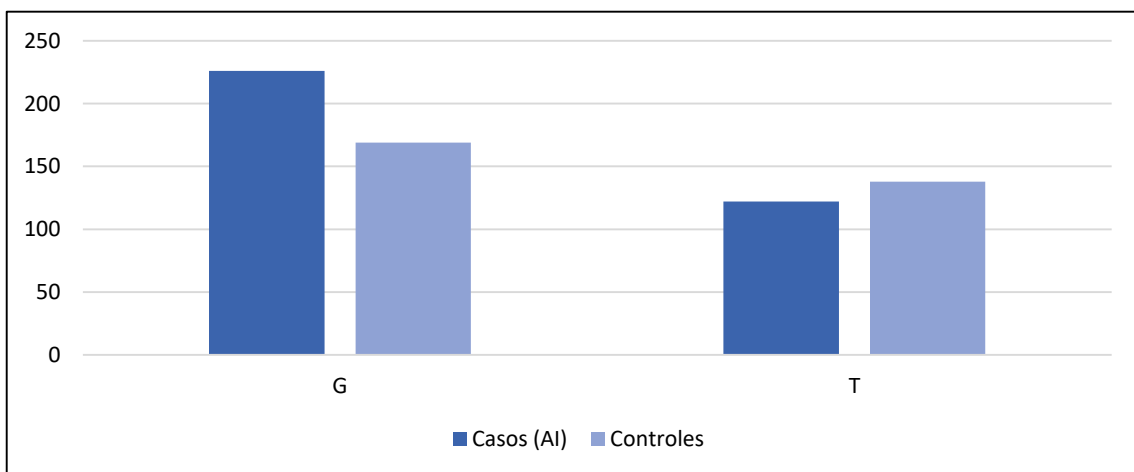


Figura 15. Diagrama de barras que refleja las frecuencias alélicas del SNP rs1799983 del gen de la enzima eNOS entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control.

A modo de resumen, en la Tabla 20 se reflejan las significaciones estadísticas de cada uno de los polimorfismos para el desarrollo de aneurismas y vasoespasmo.

Tabla 20. Resumen de la significación estadística en los polimorfismos estudiados. ns (no significativo), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

	Distrib. Genotípica y riesgo de AI	Dominancia alélica y riesgo de AI	Distrib. Genotípica y riesgo de vasoespasmo
rs833061 VEGFA	ns	ns	ns
rs2071559 VEGFR2	ns	ns	ns
rs5370 Endotelina	ns	ns	ns
rs3739817 Endoglina	ns	ns	S (*)
rs1799983 eNOS	S (*)	S (**)	ns

DISCUSIÓN

1. ASPECTOS GENERALES

La hemorragia subaracnoidea aneurismática plantea uno de los mayores retos de salud pública dentro del campo de las enfermedades neurovasculares debido a su elevada morbi-mortalidad y a que afecta a sujetos relativamente jóvenes, a diferencia de la patología ictal. Esto ha propiciado la proliferación de estudios epidemiológicos y genéticos sobre los aneurismas cerebrales durante los últimos años. Sin embargo, muchos de los mecanismos tanto ambientales como genéticos que influyen en la formación de los AI no están del todo definidos.

En nuestro trabajo hemos investigado si factores de riesgo descritos previamente por otros grupos y polimorfismos genéticos implicados en la función endotelial y estructura de la pared vascular se relacionan con la formación de aneurismas cerebrales, su ruptura y las complicaciones derivadas de presentar una HSAa. A continuación, se detalla la interpretación de los resultados obtenidos, las limitaciones del estudio y las directrices propuestas para futuras investigaciones.

2. LOS ANEURISMAS COMO PROBLEMA SOCIOSANITARIO

La hemorragia subaracnoidea aneurismática supone un problema sanitario y de salud relevante para la comunidad. Pese a ser menos frecuente que otros tipos de ictus (supone del 6 al 8% de las enfermedades cerebro-vasculares agudas) su mortalidad, en torno al 40%, es mayor y además afecta a población más joven, provocando una cantidad de años de vida perdidos similar a la provocada por el ictus isquémico y hemorrágico ⁷⁶.

Además de su elevada mortalidad, la morbilidad que produce en los pacientes que sobreviven también es muy significativa, superando el 80% de los casos y ocasionando un elevado gasto sanitario y una pérdida importante de población activa. Entre los pacientes que sobreviven, muchos presentan secuelas neurológicas a largo plazo: apenas un 50% puede volver a tener una vida independiente y un 30% desarrolla una discapacidad moderada-grave ⁴⁹.

La incidencia anual de HSAa es de 6 a 33 casos/100,000. La variabilidad se debe a la región geográfica, el género y la franja de edad principalmente ²⁵. En nuestro país en concreto, se estima una incidencia de 6.1 casos por 100.000 habitantes-año ⁷⁶.

Sin embargo, la mayoría de los aneurismas no se romperán nunca, ni producirán ningún síntoma. Su tratamiento antes de la ruptura disminuye drásticamente la morbilidad y mortalidad y los convierte en una enfermedad potencialmente curable. Esto ha incrementado el interés ante la posibilidad de detectar y tratar a los AI antes de que se rompan.

El hecho de ofrecer la posibilidad de diagnosticar su presencia en cualquier individuo, en cualquier momento y en cualquier población y ofrecer tratamiento a aquellos pacientes con AI antes de su ruptura es muy importante. No obstante, deben considerarse varios aspectos que por el momento hacen imposible realizar tales procedimientos.

El principal obstáculo es el aspecto económico, ya que los estudios que actualmente permiten el diagnóstico de un AI (AngioTC, angioresonancia o angiografía cerebral) son muy costosos y no están exentos de riesgos. Realizarlos de manera masiva y rutinaria a la población general es incosteable. Por otro lado, cada uno de estos procedimientos presenta un grado importante de error diagnóstico o falsos negativos, debido a la presencia de aneurismas menores de 3 mm, que suponen cerca de un 30% de los aneurismas encontrados en la población ¹⁴² y que son prácticamente indetectables mediante estas técnicas.

En consecuencia, el procedimiento diagnóstico más acertado sería aquel que pudiese predecir la presencia de un AI usando una simple muestra de sangre, lo que eliminaría costosas pruebas y procedimientos con riesgo para el paciente. En este sentido, el diagnóstico genético sería una opción viable de cara al futuro.

En la actualidad, el conocimiento preciso de los factores moleculares y genéticos que intervienen en la formación, crecimiento y ruptura de un AI permanecen aún en estudio. Sin embargo, el avance de los conocimientos en el campo de la genómica puede contribuir a establecer una correlación entre la presencia de un AI y la expresión de genes que pudieran servir como marcadores genéticos de riesgo para una población determinada.

De este modo, y como justificación de la presente Tesis Doctoral, creemos que podría ser una realidad en un futuro no muy lejano que el examen genético permitiese la identificación de sujetos con alto riesgo de padecer este tipo de patología y, en consecuencia, el diseño de un programa de vigilancia para un diagnóstico y tratamiento

oportunos y precoces, evitando así la mortalidad y las indeseadas secuelas asociadas a la hemorragia subaracnoidea.

3. ESTUDIO CLÍNICO. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES NO GENÉTICAS Y SU INFLUENCIA EN LA EVOLUCIÓN DE LA HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA.

3.1 HIDROCEFALIA

La hidrocefalia es la acumulación de una cantidad excesiva de líquido cefalorraquídeo en el sistema nervioso central. Esta acumulación provoca una dilatación ventricular, aumento de la presión intracraneal, deterioro neurológico e incluso la muerte si no se trata a tiempo.

Es importante su diferenciación temporal: se considera hidrocefalia aguda la que ocurre en los primeros 3 días tras la ruptura aneurismática, subaguda entre los días 4 y 14, y crónica a partir de la tercera semana ⁷⁶. El tratamiento consiste en la colocación de un DVE en fase aguda y una DVP cuando el paciente pierde la capacidad de reabsorción del LCR de manera permanente.

La incidencia de hidrocefalia es tremendamente dispar entre las series publicadas. Esto se debe a la ausencia de diferenciación entre hidrocefalia aguda y crónica en muchas de ellas. Esta proporción oscila entre el 15% y el 58% en la fase aguda, y entre el 4% y el 37% en la fase crónica ¹⁴⁷. Nuestra muestra de pacientes con hidrocefalia tiene una distribución algo superior a las series publicadas, ya que esta complicación fue observada en el 64.6% de los pacientes con HSAa.

Los factores que favorecen su aparición han sido ampliamente investigados. En varios metaanálisis recientes ^{43, 45, 48}, se enumeran los principales factores determinantes para el desarrollo de esta complicación. Entre ellos están: grado en la escala Fisher 3-4, edad superior a 50-60 años, dilatación ventricular al ingreso, resangrado, presencia de sangre intraventricular, peor grado clínico al ingreso, complicaciones como meningitis o neumonía y los aneurismas de circulación posterior como causa de sangrado.

Respecto al tratamiento recibido, clipaje o embolización del aneurisma, y su relación con el riesgo de desarrollar hidrocefalia, ha existido siempre cierta controversia, con series a favor de cada uno de los tratamientos. Recientemente dos metaanálisis han arrojado luz sobre este tema concluyendo que el riesgo de acabar necesitando una DVP es menor con el clipaje quirúrgico y mayor tras embolización^{43,50}. Como explicación, se propone que el lavado directo de la hemorragia en las cisternas durante la intervención quirúrgica y la eliminación de parte de los productos de degradación hemática sea responsable de este efecto.

En nuestra serie de pacientes con aneurismas rotos, analizamos todas estas variables y su relación con el desarrollo de hidrocefalia en algún momento de la evolución clínica. Encontramos que la presencia de hemorragia intraventricular (grado 4 en la Escala de Fisher) y un peor estado clínico al diagnóstico (Hunt y Hess) tuvieron una relación significativa con el desarrollo de esta complicación, aumentando su aparición.

No obstante, otras variables como el sexo, edad, hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, diabetes, localización del aneurisma o tratamiento recibido, no tuvieron relación significativa en nuestra serie.

3.2 VASOESPASMO

El vasoespasmo es una respuesta arterial reactiva al depósito de sangre en el espacio subaracnoideo. Se trata de una contracción involuntaria e intensa que produce una disminución del flujo sanguíneo a través de los vasos afectados. Se produce por una reacción inflamatoria e irritativa de la pared arterial a las sustancias liberadas por la lisis del coágulo.

El vasoespasmo angiográfico tiene un pico de incidencia alrededor del 7º día tras la HSAa, con una resolución gradual entre la 2º y 4º semana tras el sangrado. La incidencia estimada de vasoespasmo angiográfico es de aproximadamente 2/3 de los pacientes, de los cuales 1/3 desarrollará síntomas isquémicos, es decir, vasoespasmo clínico⁷⁶. En nuestra muestra de pacientes con HSAa, la incidencia de vasoepasmo es algo inferior a las series publicadas, ya que esta complicación fue observada en el 18.1% de los pacientes.

Se trata de una complicación grave, ya que puede acabar provocando isquemia cerebral diferida hasta en un 26% de los pacientes ¹³⁵, lo que conlleva secuelas neurológicas e incluso la muerte. Hoy en día, pese a los tratamientos tanto preventivos como activos de esta complicación, el vasoespasmo es el responsable de en torno a un 7% de los fallecimientos tras una HSAa ⁵⁴.

Entre los factores relacionados con la aparición de vasoespasmo, el más importante es la gravedad de la hemorragia en la TC craneal (Escala de Fisher), seguido del tabaquismo y la hipertensión arterial. Otros como una mala situación neurológica inicial, el resangrado y la presencia hemorragia intraventricular muestran una tendencia al vasoespasmo mayor pero no significativa ^{6, 7}. Estudios publicados con posterioridad apuntan que la glucemia elevada ⁹ y una menor edad aumentan la incidencia de vasoespasmo radiológico, pese a lo cual no hay mayor frecuencia de ICD ¹⁰.

En nuestra serie de pacientes con aneurismas rotos, analizamos todas estas variables y su relación con el desarrollo de vasoespasmo en algún momento de la evolución clínica. Encontramos que el volumen de la hemorragia (grados 3 y 4 en la Escala de Fisher) sí tuvo relación significativa con el desarrollo de vasoespasmo. Además, observamos que el desarrollo de esta complicación tenía relación con un peor pronóstico vital y funcional, multiplicando casi al doble el riesgo de presentar secuelas en el futuro y/o fallecer.

Otras variables como el sexo, edad, hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, diabetes, localización del aneurisma, tratamiento recibido y estado neurológico inicial (escala de Hunt y Hess) no tuvieron relación significativa en nuestra serie.

4 ESTUDIO GENÉTICO

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

El concepto de que existen factores genéticos asociados al desarrollo de AI ha permitido diseñar modelos de estudio en diversos genes candidatos que, por su naturaleza y función, pueden estar involucrados en el desarrollo de los aneurismas.

A la hora de investigar los genes responsables de una patología concreta, existen dos grandes tipos de estudios: los estudios de gen candidato y los que exploran todo el

genoma, conocidos como estudios de genotipado masivo o GWAs (*Genome Wide Association studies*). En el caso de los aneurismas, la mayoría de las evidencias proceden del análisis de asociación, en los que se determina la relación entre el desarrollo de una enfermedad concreta y una mutación específica en individuos afectados y sanos ¹¹⁷.

Los estudios de asociación de casos y controles como el nuestro se incluyen dentro de la primera categoría y comparan la frecuencia de los alelos o genotipos de un polimorfismo en ambos grupos. Tienen la ventaja de que son baratos y tienen poder estadístico suficiente para detectar variantes de baja penetrancia, por lo que han sido y aún son la estrategia más empleada para caracterizar la aportación de uno o varios genes a una enfermedad. Estos estudios son adecuados cuando se tiene una hipótesis biológica o para establecer las variantes genéticas que subyacen a las patologías complejas o poligénicas, como es nuestro caso.

No obstante, estos estudios presentan unas particularidades que afectan a la interpretación de los resultados. La relación entre un polimorfismo y una enfermedad es más consistente cuanto mayor es el tamaño de la muestra, si el gen se localiza en una zona de ligamiento relacionada (en el caso de los AI, en una zona relacionada con las proteínas implicadas en la formación de la pared arterial) o si se ha demostrado esta relación en modelos animales ²¹.

Por el contrario, la principal crítica que se hace a estos estudios es que con frecuencia sus resultados no pueden ser replicados y las asociaciones que se observan son, por lo tanto, falsos positivos. El pequeño tamaño muestral suele ser la principal causa de estas discrepancias, dado que la mayoría de los estudios incluyen entre 100 y 500 sujetos y, por lo tanto, carecen de poder estadístico suficiente. Esto ha tratado de solventarse con la realización de meta-análisis que incluyen todos los estudios publicados para un determinado SNP, aumentando así el tamaño muestral y la consistencia de los resultados. Además, los diferentes resultados vertidos por unos y otros estudios obedecen en muchos casos a que se han realizado en individuos de etnias diferentes, sugiriendo que los polimorfismos que modifican el riesgo de una determinada patología en un grupo étnico podrían carecer de significado en otro ⁶⁰. Otra limitación es que cuanto mayor es el número de polimorfismos a estudio, mayor es la probabilidad de la existencia de asociaciones que ocurren al azar, y que pueden existir factores ambientales o interacciones genéticas que modifiquen el efecto de la variante a estudio originando un sesgo que puede llevar a conclusiones erróneas ¹⁶.

En resumen, los estudios de asociación de casos y controles deben cumplir los siguientes requisitos:

1. La población a estudio debe pertenecer al mismo grupo étnico. Una etnia concreta puede tener mayor probabilidad de padecer una enfermedad por razones socio-culturales o diferente frecuencia alélica para un polimorfismo determinado. Si el grupo es heterogéneo en cuanto a su etnia, podrían encontrarse asociaciones debidas a la presencia de este grupo y no por la existencia de genes de susceptibilidad. En nuestro trabajo todos los casos y controles son de raza caucásica y origen español.
2. El polimorfismo debe tener relevancia, es decir, debe modificar la regulación del gen (SNP promotor) o la estructura primaria del mismo (SNP de exón).
3. La proteína codificada por el gen a estudio debe estar implicada en la patogenia de la enfermedad. Para nuestro estudio hemos realizado una búsqueda exhaustiva en publicaciones previas que constatasen la relación de estos genes con el desarrollo de AI.
4. La definición del fenotipo de enfermedad para que sea posible su categorización y comparación con el grupo control. En nuestro caso, se incluyeron los pacientes diagnosticados de AI (confirmado mediante angiografía cerebral).
5. Procesado minucioso de las muestras para evitar errores de contaminación, repitiendo el análisis genético cuando el grado de discriminación alélica resulta confuso y comprobando si la distribución genotípica para todos los polimorfismos estudiados y todos los grupos se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg.
6. En cuanto a la interpretación de resultados estadísticamente significativos, la relación entre el polimorfismo estudiado y la enfermedad puede ser:
 - a. Verdadera y directa: cuando existe una asociación real entre la variante genética y la enfermedad, siendo esta un factor de riesgo.
 - b. Verdadera e indirecta: cuando el polimorfismo se asocia a otra variante que es la que tiene relación directa con la patogenia de la enfermedad (desequilibrio de ligamiento). La variante estudiada no sería el causante, sino un marcador de enfermedad.
 - c. Falso positivo: causado por la presencia de sesgos o el azar.

Cuando los resultados son negativos puede deberse a que la variante genética estudiada no tiene relación con la enfermedad, a la presencia de sesgos o a que la proteína

codificada por ese gen no tenga la suficiente repercusión funcional, o la tenga sólo cuando interactúa con otros genes o factores ambientales. Debido a la existencia de varios polimorfismos en un mismo gen, la ausencia de asociación de alguno de ellos no descarta que exista relación entre el gen y la enfermedad.

En nuestro trabajo, hemos realizado un análisis de regresión logística, para controlar las variables de edad y género y así confirmar que los hallazgos observados tienen lugar con independencia de estas variables. Con la misma finalidad, se llevó a cabo un análisis multivariante del riesgo de presentar AI asociado al alelo y a los genotipos de los polimorfismos estudiados.

Además, para poder conocer si el grupo control era representativo de la distribución de sujetos sin aneurismas dentro de la población general, se realizó el estudio de equilibrio de poblaciones de Hardy-Weinberg que nos permitió comprobar la representatividad del grupo respecto de la población general sin aneurismas y que por tanto da validez a los resultados obtenidos.

4.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

La fisiopatología de la aparición y desarrollo de los aneurismas intracraneales permanece en gran medida sin identificar.

Han sido descritos múltiples veces en la literatura los factores tanto clínicos como ambientales asociados a la presencia de un AI. La hipertensión, el tabaquismo o el consumo de alcohol son agentes claramente relacionados con la formación de un aneurisma³⁴. Así mismo, existen elementos ambientales, como el estrés hemodinámico de la pared arterial, la fuerza que ejerce el flujo sanguíneo sobre la misma o los defectos en la túnica media, que explican que muchos de los aneurismas se originen en localizaciones determinadas tales como las bifurcaciones arteriales^{15, 99, 132}

Sin embargo, además de los factores de riesgo ambientales y clínicos mencionados anteriormente, existen factores genéticos que podrían ser cruciales en la formación y evolución clínica de los AI⁹⁸. Actualmente existe un amplio campo en la investigación que se ha centrado en estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la formación y progresión de un aneurisma, proponiendo diversas hipótesis que tratan de explicar el origen y desarrollo de este tipo de alteraciones vasculares tomando en cuenta

los estudios histopatológicos y los modelos experimentales. De este modo, se han descrito múltiples loci asociados con la el desarrollo de aneurismas y la mayoría de ellos están implicados en vías relacionadas con el mantenimiento del endotelio vascular y la integridad de la matriz extracelular de la pared arterial ^{1, 150, 151}.

Motivados por estas investigaciones, el objetivo de nuestro estudio fue caracterizar si determinados polimorfismos en genes implicados en el mantenimiento del endotelio vascular (rs833061 VEGFA, rs2071559 VEGFR2, rs5370 Endotelina, rs3739817 Endoglina y rs1799983 eNOS) podrían modificar el riesgo de desarrollar AI en una muestra de pacientes españoles.

No se encontraron diferencias significativas en el genotipo y distribuciones alélicas de los polimorfismos rs833061 VEGFA, rs2071559 VEGFR2, rs5370 Endotelina, rs3739817 Endoglina entre el grupo de pacientes con AI y el grupo control. Sin embargo, estos resultados no excluyen la participación de cualquiera de estos genes en la patogénesis de los aneurismas cerebrales, ya que sólo ha sido estudiado un polimorfismo concreto para cada gen. A pesar de no haber encontrado relación entre estos polimorfismos concretos y el desarrollo de aneurismas, esta información tiene relevancia a la hora de orientar futuras investigaciones, ya que, hasta la fecha, ésta ha sido la primera vez que han sido estudiados en su relación con el desarrollo de AI.

Por otro lado, cabe mencionar que nuestros resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica para el polimorfismo rs1799983 eNOS entre pacientes con aneurismas y sujetos sanos. Ser portador del alelo G de dicho polimorfismo se asoció con un mayor riesgo de desarrollo de aneurismas.

POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) promueve el crecimiento de los vasos sanguíneos desempeñando un papel importante en la angiogénesis ¹¹³. Estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y su motilidad, iniciando la gemación de nuevos capilares. Además, funciona como quimiotáctico de macrófagos y granulocitos, participa en la creación de la luz y las fenestraciones de los vasos sanguíneos y produce vasodilatación indirecta (por liberación de NO). El gen que codifica esta proteína está situado en el brazo corto del cromosoma 6, localización 6p21.1.

Su mecanismo de acción depende de su unión a través de unos receptores específicos entre los que se encuentra VEGFR-2¹³⁸. El gen que lo codifica se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4, localización 4q12. La unión de VEGFA activa la fosforilación de residuos de tirosina específicos en el dominio intracelular de VEGFR2, permitiendo la activación de múltiples cascadas de señalización que afectan a la angiogénesis, supervivencia, proliferación y migración endotelial.

En los últimos años se han descrito diversos polimorfismos del gen VEGFA y su relación con varias enfermedades cerebro-vasculares tales como la isquemia cerebral^{138, 148} y hemorragias cerebrales hipertensivas⁵².

En cuanto al desarrollo de AI, el grupo de Tao et al., analizó la relación de los polimorfismos rs3025039 y rs201096 del gen VEGFA en 114 pacientes y la presencia de AI. Encontraron una relación significativa entre la presencia del alelo T del SNP rs3025039 y el desarrollo de AI ($p=,006$, $OR= 1,812$), además de con el número y tamaño de los mismos. Sin embargo, el polimorfismo rs2010963 no tuvo asociación significativa con ninguna de las variables analizadas¹²⁶.

Otro estudio de Maderna et al., investigó el papel del VEGF y sus receptores relacionados (VEGFR1 y VEGFR2) con la fisiopatología de los AI. Realizaron estudios inmuno-histoquímicos de estos marcadores en muestras de seis aneurismas no rotos y en dos muestras de pared arterial normal como control. Los resultados mostraron un patrón diferente de tinción y por tanto de expresión de VEGF/VEGFR1/VEGFR2 en los aneurismas en comparación con los controles. Se observó que existía una pérdida de expresión de VEGFR1 y una expresión moderada de VEGFR2, respaldando la hipótesis de su alteración con la formación de aneurismas⁸⁸.

En nuestro estudio, sobre el polimorfismo rs833061 del gen VEGFA y el polimorfismo rs2071559 del gen VEGFR2, no encontramos en ninguno de los dos casos diferencias significativas en la distribución genotípica ni en la frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Dentro del grupo de pacientes con aneurismas, analizamos la relación de ambos polimorfismos y el riesgo de ruptura aneurismática y no encontramos diferencias significativas. En un análisis por separado del grupo de pacientes con aneurismas rotos (aquellos que habían sufrido una HSAa), tampoco encontramos diferencias entre la

distribución genotípica ni la frecuencia alélica de estos dos polimorfismos y el desarrollo de vasoespasmo o el pronóstico vital y funcional.

POLIMORFISMOS DEL GEN ENDOTELINA 1.

La ET-1 es un péptido producido en las células endoteliales vasculares. Está codificado por el gen EDN1 situado en el brazo corto del cromosoma 6, localización 6p24.1. Mediante su unión a los receptores del músculo liso vascular adyacente produce una intensa vasoconstricción y contribuye al mantenimiento endógeno del tono vascular. Por eso, es un péptido altamente involucrado en enfermedades tales como la hipertensión arterial sistémica, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, cardiomiopatías e insuficiencia renal ⁵.

La producción de ET-1 se induce por factores como la hipoxia e isquemia. Esto explica que, en condiciones patológicas, como una HSAa, se incremente la producción de ET-1, causando un desequilibrio entre los efectos vasodilatadores del NO y los efectos vasoconstrictores mediados por la ET-1 y produciendo vasoconstricción, estrés oxidativo e inflamación, lo que supone un papel importante en el Vasoespasmo ¹³.

Existen diversos trabajos que han analizado los polimorfismos de los genes responsables de la codificación de los receptores de endotelina (ENDRA, ENDRB y END1). En sus resultados encontraron que existían polimorfismos concretos que se asociaban con la ruptura aneurismática y el resangrado tras una HSAa, como el estudio de Foreman et al., en el que analizaron la asociación entre el polimorfismo rs2070699 del gen END1 y el resangrado, concluyendo que el alelo T era un factor independiente para el resangrado en estos pacientes ³⁸.

También ha sido analizada su relación con el vasoespasmo clínico. Grissenauer et al. ⁴⁷ analizaron la asociación entre END1 y ENDRA y la ruptura aneurismática y el desarrollo de vasoespasmo clínico, ICD y un mal resultado neurológico. En sus resultados, encontraron que el alelo T del SNP END1 T/G rs1800541 se asociaba con la ruptura aneurismática, mientras que el alelo G del SNP ENDRA G/C rs5335 estaba relacionado con la presencia de vasoespasmo clínico.

Un metaanálisis del año 2013 que incluyó 61 estudios, con un total de 32.887 pacientes con aneurismas y 83.683 controles, identificó 19 polimorfismos posibles

candidatos predisponentes a la formación de aneurismas ¹. Entre los SNP analizados, el análisis reveló una asociación significativa del gen del receptor de la ET-1 con la presencia de AI (OR=1.22).

Otros grupos de trabajo se han centrado en medir los niveles de Endotelina-1 en sangre periférica y LCR y estudiar su asociación con el desarrollo de vasoespasmo. Kessler et al. ⁶², midieron la concentración de ET-1 en plasma y LCR en una muestra de 30 pacientes con HSAa tras la ruptura del aneurisma y la compararon 10 controles. Observaron que existía un aumento significativo en los niveles de ET-1 en el LCR, pero no en el plasma, en pacientes que desarrollaban vasoespasmo, por lo que concluyeron que la ET-1 podría estar implicada en la patogénesis del vasoespasmo asociado a HSAa.

Thampatty y su grupo ¹²⁸ analizaron en una muestra de 106 pacientes con aneurismas rotos, los niveles de ET-1 diariamente durante los primeros 14 días tras la HSAa y observaron que se elevaban en todos los pacientes. Sin embargo, en aquellos que desarrollaban vasoespasmo, estos niveles se elevaban de una manera más aguda y esa elevación precedía en 72 horas a la aparición de vasoespasmo radiológico y deterioro neurológico clínico.

Por otro lado, Fassbender et al. ³³ cuantificaron comparativamente los niveles de expresión de ARNm de ET-1 en leucocitos presentes en el LCR de 35 pacientes con HSAa y 20 sujetos control. Observaron que la expresión y, por tanto, los niveles de ET-1 eran mayores en sujetos que habían sufrido una HSAa y postularon que este hallazgo sobre la inflamación subaracnoidea podría representar un objetivo terapéutico para prevenir el vasoespasmo y la isquemia cerebral diferida tras una ruptura aneurismática.

A raíz de estos trabajos, surgieron ensayos clínicos aleatorizados (como el CONSCIOUS) que analizaron el efecto de un antagonista del receptor de ET-1 (Clazosentán), demostrando que el fármaco disminuye significativamente la aparición de vasoespasmo y la necesidad de tratamiento agresivo para la prevención del mismo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de tratamiento y el grupo control en cuanto a la aparición de complicaciones isquémicas y pronóstico desfavorable ^{51, 87}.

En nuestro estudio, sobre el polimorfismo rs5370 del gen de la Endotelina-1, no encontramos diferencias significativas en la distribución genotípica ni en la frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Dentro del grupo con aneurismas, analizamos la relación de este polimorfismo y el riesgo de ruptura y no encontramos diferencias significativas. En un análisis por separado del grupo de pacientes con aneurismas rotos (aquellos que habían sufrido una HSAa), tampoco encontramos diferencias entre la distribución genotípica ni la frecuencia alélica de este polimorfismo y el desarrollo de vasoespasmo o el pronóstico vital y funcional.

Estos resultados, aunque puedan parecer desalentadores, creemos que no desacreditan a la ET-1 como mediador vital en la formación de aneurismas y desarrollo del vasoespasmo tras una ruptura aneurismática y que futuros estudios deberían orientarse a otras dianas genéticas dentro del estudio de este gen y a la valoración de los niveles de ET-1 en entornos cercanos al aneurisma (pared vascular, sangre dentro del saco aneurismático, etc).

POLIMORFISMOS DEL GEN ENDOGLINA.

La endoglina es una glucoproteína de membrana presente en las células endoteliales formando parte del complejo receptor del TGF- β . Interviene activamente en el proceso angiogénico, facilitando el crecimiento del endotelio vascular y reclutando células del músculo liso, lo que permite la maduración de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Su ausencia impide el desarrollo de las células endoteliales causando anomalías angiogénicas ^{44, 129}.

El gen que codifica la endoglina se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 9 ³⁵. En humanos, las mutaciones de este gen son las responsables de un trastorno vascular autosómico dominante que se denomina telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 1 (HHT1) ⁹⁰. Esta enfermedad, de herencia autosómica dominante, se caracteriza por la presencia de malformaciones arteriovenosas y hemorragias secundarias. Afecta predominantemente a la piel y mucosas, aunque puede causar malformaciones arteriovenosas en otros órganos como el cerebro, los pulmones y el hígado.

El grupo de Galaris et al., realizó un trabajo con ratones knockout que no poseían el gen de la Endoglina, observando que existía una correlación positiva entre los niveles basales bajos o ausentes de endoglina y el desarrollo de anomalías vasculares en

determinados órganos. Observaron que la endoglina era particularmente baja en la piel, el sitio más temprano de lesiones vasculares en HHT1 ⁴¹.

En cuanto a su relación con la presencia de aneurismas cerebrales, hay resultados contradictorios. Mientras que en unos estudios no se ha encontrado relación entre polimorfismos determinados del gen de la Endoglina y el desarrollo de AI, en otros sí.

En un estudio llevado a cabo en Corea por el grupo de Joo et al., con 342 pacientes y 253 controles, se analizó la relación del polimorfismo rs1800956 del gen de la Endoglina con la presencia de AI, no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos ⁶⁵. Por el contrario, otro estudio analizó el polimorfismo rs1800956 en una muestra de 313 paciente de la etnia Han, en China, demostró que la presencia del alelo G de este SNP estaba relacionada con el desarrollo de aneurismas cerebrales ($p=0.018$; OR 1.56), independientemente de factores convencionales, como edad, sexo, presión arterial, tabaquismo y consumo de alcohol ⁸⁰.

Un metanálisis llevado a cabo en el 2015 analizó la asociación entre los polimorfismos 6bINS y rs1800956 del gen de la Endoglina y el riesgo de AI. Se incluyeron 11 estudios con un total de 1501 casos y 2012 controles. No encontraron asociación entre el polimorfismo 6bINS con el riesgo general de AI, pero sí con un mayor riesgo de AI familiares (OR = 1.64). Respecto al SNP rs1800956, sí se encontró relación significativa con la aparición de IA ⁵⁶.

Ante estos resultados contradictorios, nos pareció interesante introducir un polimorfismo relacionado con el gen de la Endoglina no estudiado hasta la fecha (rs3739817) y analizar su relación con el desarrollo de aneurismas. No obstante, en nuestro estudio, no encontramos diferencias significativas en la distribución genotípica ni en la frecuencia alélica entre el grupo de pacientes con AI y el de controles sanos.

Por otro lado, otros autores han postulado la posible relación de la endoglina con el tono vascular y, en consecuencia, con el vasoespasmo. Sus fundamentos se basan en el papel del TGF- β y sus receptores en la regulación del tono vascular, ya que produciría un aumento de la actividad transcripcional del promotor de ET-1, con el consecuente efecto vasoconstrictor de esta citokina ⁷⁷. Todos los estudios relacionados con esta hipótesis, analizan la relación entre los niveles séricos o en LCR de endoglina y su relación con la aparición de vasoespasmo en los pacientes que han sufrido una HSAA, llegando a

conclusiones en cierta parte contradictorias y que aumentan la controversia sobre este mediador.

Testai et al.¹²⁷ midieron los niveles en LCR de endoglina soluble en controles y pacientes con HSAa dentro de las 48 h posteriores al sangrado y observaron que los pacientes con HSAa tenían niveles significativamente más altos de endoglina en el LCR (0,037 frente a 0,251 ng/ml; P = 0,02) y que cuanto mayores eran estos niveles, mayor era el riesgo de presentar vasoespasmos.

A continuación, el grupo de Dietmann et al.²⁷, analizó los niveles séricos de endoglina soluble y los niveles plasmáticos de TGF- β 1 en 20 pacientes con HSAa dentro de los 15 días posteriores al sangrado y los compararon con los de 20 sujetos sanos. Observaron que los niveles séricos de endoglina eran significativamente más bajos en los pacientes con HSAa y los niveles plasmáticos de TGF- β 1 más altos. Además, encontraron asociación entre esta alteración y la aparición de vasoespasmos, concluyendo que los niveles de endoglina inferiores a 3,88 ng/ml o los niveles de TGF- β 1 superiores a 7,2 ng/ml tenían un valor predictivo para el desarrollo de vasoespasmos e isquemia cerebral diferida. Además, comprobaron que los niveles bajos de endoglina fueron altamente predictivos de un resultado funcional deficiente a largo plazo (escala de Rankin modificada ≥ 2) a los 6 meses después de la HSAa.

Estos estudios no son del todo contradictorios, ya que analizan los niveles de endoglina en medios diferentes (plasma Vs LCR) y ponen el foco en mediadores diferentes. Sin embargo, parece claro que la endoglina es un biomarcador pronóstico para la aparición de complicaciones secundarias, tales como el vasoespasmos y el resultado funcional a largo plazo después de la HSAa.

Esta controversia nos animó a analizar este gen y su posible relación con los aneurismas, su ruptura y sus consecuencias. Dentro del grupo de sujetos con aneurismas, analizamos la relación del polimorfismo rs3739817 y el riesgo de ruptura y no encontramos diferencias significativas.

En un análisis por separado del grupo de pacientes con aneurismas rotos (aquellos que habían sufrido una HSAa), sí encontramos diferencias entre la distribución genotípica de este polimorfismo y el desarrollo de vasoespasmos. Los pacientes heterocigotos T/C para este gen, tenían un mayor riesgo de presentar vasoespasmos ($p < 0.05$). Sin embargo, en cuanto al pronóstico vital y funcional no observamos diferencias.

POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (eNOS)

La eNOS es una de las 3 isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa. Es codificada por el gen NOS3, que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, localización 7q36.1.

Se expresa principalmente a nivel del endotelio vascular y su principal función es la síntesis de óxido nítrico. El NO funciona como vasodilatador, modulando la actividad de los canales de calcio y provocando la relajación del músculo liso vascular. Además, interviene en la proliferación celular del sistema vascular, tiene un efecto antiagregante plaquetario y evita la adhesión leucocitaria local ^{102, 115}.

La importancia de esta enzima radica en que participa tanto en funciones hemodinámicas como estructurales y su ausencia o disminución podría provocar debilitamiento de la pared vascular o su rotura, participando en la patogénesis de enfermedades vasculares tales como: la aterosclerosis, hipertensión, infarto de miocardio ^{100, 141} o la formación de aneurismas ⁴². Además, su acción es muy importante en los casos de HSA, ya que estaría relacionada con el vasoespasmo y la ICD ⁶³.

Diversos estudios han analizado determinados polimorfismos de eNOS y su relación con la fisiopatología del desarrollo de AI y su ruptura. En el 2008, Özüm et al. reportaron que el genotipo TT del polimorfismo G894T del gen eNOS3 estaba asociado con el riesgo de ruptura aneurismática ¹⁰¹. Otros investigadores, como el grupo de Khurana et al. encontraron que la heterocigosidad T/C del polimorfismo rs2070744 se asociaba con mayor tamaño aneurismático ⁶³ y que los polimorfismos intrón 27VNTR y rs2070744 estaban relacionados con un riesgo mayor de presentar una HSAa, que ésta sea profusa (grados 3 y 4 de Fisher) y se desarrolle Vasoespasmo ⁶⁸. Song et al. analizaron el papel del polimorfismo rs2070744, concluyendo que no existía relación con la ruptura aneurismática, pero sí con un peor pronóstico neurológico ¹²².

En cuanto al vasoespasmo, existen diversos trabajos que han analizado la relación de múltiples polimorfismos con la aparición de esta complicación. El grupo de Ko et al., concluyó que el polimorfismo rs2070744 estaba relacionado con una mayor presencia de vasoespasmo cerebral, particularmente en pacientes homocigotos para el alelo C ⁷⁰. Por otro lado, Starke et al. analizó el polimorfismo rs2070744, concluyendo que los pacientes

homocigotos para el alelo T presentaban un riesgo de vasoespasma cerebral 10,9 veces mayor ¹²³.

Respecto al riesgo de desarrollar aneurismas cerebrales, se han estudiado también múltiples polimorfismos en el gen eNOS. Sin embargo, los resultados de las investigaciones realizadas siguen siendo un tema de controversia entre la comunidad científica por sus hallazgos divergentes. Un metaanálisis realizado en 2018 por Paschoal et al. ¹⁰⁴, analizó la asociación entre el polimorfismo T786C y el riesgo de presentar AI. Se incluyeron 9 estudios y tras su análisis se concluyó que este polimorfismo estaba relacionado con la presencia de AI. El modelo dominante T786C aumentaba el riesgo (OR 1.22, $p = 0.01$), mientras que el modelo recesivo T786C tenía un efecto contrario (OR 0.37, $p < 0.0001$). Otra revisión sistemática realizada por el grupo de Yang que incluía 26 estudios, revisó la relación entre los polimorfismos de eNOS T786C, G894T, VNTR de 27 y el riesgo de desarrollar AI. En el análisis general, no se encontró evidencia de asociación entre estos polimorfismos y la susceptibilidad a presentar aneurismas cerebrales. Sin embargo, se observó que el polimorfismo T786C se asoció con un mayor riesgo de AI entre los sujetos asiáticos ¹⁴⁹.

En relación al presente estudio, nuestros resultados apoyan la relación de este gen con la formación de aneurismas ya reflejada en la literatura previa. Observamos diferencias significativas en la distribución genotípica para el polimorfismo rs1799983 entre pacientes con AI y sujetos sanos. Ser portador del genotipo TT y del alelo T se asoció con un menor riesgo de desarrollar aneurisma cerebral. De este modo, ser portador del alelo G se asoció con un mayor riesgo de desarrollar AI.

Este mismo polimorfismo (rs1799983) había sido estudiado previamente en trabajos como el de Wang et al., en el que observaron que el alelo G reducía la actividad de la enzima eNOS, alterando el endotelio vascular y aumentando el riesgo de desarrollar AI. Junto a esta variable, analizaron el efecto del tabaquismo, observando que fumar disminuía de una manera significativa la actividad de la enzima eNOS para el alelo G (no afectando al alelo T), lo cual aumentaba todavía más el riesgo de presentar aneurismas. Concluyeron que la actividad enzimática de eNOS es modificable al fumar y que los efectos del tabaquismo dependen de los genotipos de eNOS ¹⁴⁰.

En cuanto a la relación de eNOS y el vasoespasma, existen múltiples trabajos que detallan los mecanismos fisiopatológicos de esta asociación. Pluta et al. ¹⁰⁶ apuntan que,

en la HSAA, la oxihemoglobina liberada por el coágulo subaracnoideo que envuelve las arterias, elimina el NO. Esto provoca la vasoconstricción que inicia el vasoespasma. Este estrechamiento arterial aumenta la tensión en la pared arterial y estimula la eNOS, lo que en condiciones normales conduciría a una mayor producción de NO y dilatación de las arterias. Sin embargo, esto no ocurre debido a la disfunción transitoria de eNOS provocada por niveles elevados de un inhibidor endógeno de eNOS, la dimetilarginina asimétrica (ADMA). Los niveles elevados de ADMA son el resultado de una disminución de la eliminación debido a la inhibición de la enzima hidrolizante de ADMA (DDAH 2) en las arterias en espasmo por los metabolitos de la hemoglobina. Esta disfunción de eNOS mantiene el vasoespasma hasta que los niveles de ADMA disminuyen y aumenta la liberación de NO de las células endoteliales.

Más adelante, el mismo autor analizó los niveles de ADMA en el LCR y su relación con el vasoespasma y pudo concluir que los niveles elevados de ADMA están estrechamente relacionados con el grado y la evolución temporal del vasoespasma. Cuando los niveles de ADMA en el LCR disminuyen, el vasoespasma se resuelve. Por lo tanto, la administración exógena de NO, que estimula la enzima hidrolizante de ADMA (DDAH 2), puede proporcionar nuevas modalidades terapéuticas para prevenir y tratar el Vasoespasma ¹⁰⁷.

Volviendo a nuestro trabajo, realizamos un análisis dentro del subgrupo de pacientes con aneurismas, estudiando la relación de este polimorfismo y el riesgo de ruptura y no encontramos relación significativa. En un análisis por separado del grupo de pacientes que habían sufrido una HSAA, tampoco encontramos diferencias entre la distribución genotípica ni la frecuencia alélica de este polimorfismo y el desarrollo de vasoespasma o el pronóstico vital y funcional.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra la asociación de alelo G del polimorfismo rs1799983 con un mayor riesgo de sufrir aneurismas cerebrales. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que las variantes genéticas del gen eNOS podrían ser cruciales en la patogénesis de los aneurismas cerebrales.

Aunque en el futuro serán necesarios más estudios para describir el papel específico de la enzima eNOS en las enfermedades cerebrovasculares y cómo variantes genéticas del gen eNOS podrían modular el proceso fisiopatológico de la formación aneurismática y el vasoespasma, creemos que nuestros resultados pueden tener gran

importancia a la hora de ampliar el conocimiento de factores de riesgo genéticos asociados a la formación y evolución clínica de los AI.

5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Entre las limitaciones de este estudio están las propias de cualquier estudio de casos y controles que analice polimorfismos genéticos:

1. Su carácter unicéntrico, que dificulta la extrapolación de los resultados a la población global. Al centrarse nuestro estudio en una población concreta, en este caso individuos caucásicos de origen español, resulta difícil extrapolar los resultados obtenidos a la población general debido a las variaciones genéticas entre poblaciones y etnias distintas y a la distinta prevalencia de aneurismas cerebrales entre poblaciones caucásicas y asiáticas, siendo necesarios nuevos estudios en otros grupos étnicos.
2. El número de pacientes incluidos ($n = 176$) no fue muy amplio; por ello, nuestros resultados deben interpretarse con cautela debido al pequeño tamaño muestral. Creemos que son necesarios nuevos estudios con un mayor número de pacientes que corroboren estos resultados. Aun así, creemos que este trabajo de tesis doctoral ha podido ser suficiente para proporcionar información valiosa con respecto a un “patrón de asociación”, más que una “causalidad definida” entre los polimorfismos estudiados.
3. En el grupo control no se realizaron estudios invasivos para descartar la presencia de AI (como la angiografía cerebral), por razones éticas. Sin embargo, en el análisis de los datos, se incluyó el factor de error asumible a la prevalencia de esta patología en la población general.
4. En el grupo control se incluyeron sujetos sanos, sin patologías médicas conocidas. Quedaron excluidos del estudio los individuos fumadores y los diagnosticados de hipertensión arterial o con antecedentes familiares de AI. No obstante, no se realizaron tomas de tensión arterial para descartar individuos hipertensos no

conocidos (en nuestro medio la incidencia de HTA en menores de 40 años puede alcanzar hasta un 10%).

CONCLUSIONES

1. Los pacientes portadores del alelo G del polimorfismo rs1799983 del gen eNOS presentan una mayor predisposición a padecer aneurismas cerebrales, por lo que debe considerarse como un posible marcador.
2. La no significación estadística encontrada en los polimorfismos rs833061 del gen VEGFA, rs2071559 del gen VEGFR2, rs5370 del gen de la Endotelina y rs3739817 del gen de la Endoglina en relación al desarrollo de aneurismas cerebrales, contribuye a la controversia existente en los resultados publicados en la literatura hasta ahora.
3. La homocigosis del rs3739817 del gen de la Endoglina se comporta como factor protector frente al desarrollo de vasoespasmo.
4. El pronóstico vital y funcional del paciente no depende de los polimorfismos estudiados.
5. Las escalas establecidas para la valoración de la hemorragia subaracnoidea aneurismática (Fisher y Hunt y Hess) constituyen un marcador de riesgo de desarrollo tanto de hidrocefalia como de vasoespasmo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: a meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology*. 2013; 80:2154–2165.
2. Bacigaluppi S, Piccinelli M, Antiga L, Veneziani A, Passerini T, Rampini P, et al. Factors affecting formation and rupture of intracranial saccular aneurysms. *Neurosurg Rev*. 2014; 37(1):1-14.
3. Backes D, Rinkel GJE, Laban KG, Algra A, Vergouwen MDI. Patient- and Aneurysm-Specific Risk Factors for Intracranial Aneurysm Growth: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2016; 47(4):951-957.
4. Bakker MK, van der Spek RAA, van Rheenen W et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 17 risk loci and genetic overlap with clinical risk factors. *Nat. Genet*. 2020; 52(12):1303–1313.
5. Baltazares M, Rodríguez H, Ortega J, Sotres-Vega A, Baltazares M. Sistema endotelina. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex*. 2005; 18(4): 308-320.
6. Berman M.F, Solomon R.A, Mayer S.A, Johnston S.C, Yung P.P. Impact of hospital-related factors on outcome after treatment of cerebral aneurysms. *Stroke*. 2003; 34: 2200-2207.
7. Boet R, Poon WS, Lam JM, Yu SC. The surgical treatment of intracranial aneurysms based on computer tomographic angiography alone-streamlining the acute management of symptomatic aneurysms. *Acta Neurochir. (Wien)* 2003; 145: 101-105.
8. Bor ASE, Tiel Groenestege AT, terBrugge KG, Agid R, Velthuis BK, Rinkel GJE, et al. Clinical, Radiological, and Flow-Related Risk Factors for Growth of Untreated, Unruptured Intracranial Aneurysms. *Stroke*. 2015; 46(1):42-48.
9. Bracard S, Abdel-Kerim A, Thuillier L, Klein O, Anxionnat R, Finitsis S, et al. Endovascular coilocclusion of 152 middle cerebral artery aneurysms: initial and midterm angiographic and clinical results. *J Neurosurg*. 2010; 112: 703-708.
10. Brilstra EH, Rinkel GJ, van der GY, van Rooij WJ, Algra A. Treatment of intracranial aneurysms by embolization with coils: a systematic review. *Stroke*. 1999; 30: 470-476.
11. Broderick JP, Brown RD Jr, Sauerbeck L, Hornung R, Huston J 3rd, Woo D et al. Greater rupture risk for familial as compared to sporadic unruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 2009; 40:1952–1957.

12. Budohoski KP, Czosnyka M, Kirkpatrick PJ, Smielewski P, Steiner LA, Pickard JD. Clinical relevance of cerebral autoregulation following subarachnoid haemorrhage. *Nat. Rev. Neurol.* 2013; 9(3):152-163.
13. Budohoski KP, Guilfoyle M, Helmy, A, Huuskonen T, Czosnyka M, Kirollos R. et al. The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischemia following subarachnoid haemorrhage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2014; 85:1343–1353.
14. Cahill WJ, Calvert JH, Zhang JH. Mechanisms of Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26(11):1341-1353.
15. Canham PB, Finlay HM. Morphometry of Medial Gaps of Human Brain Artery Branches. *Stroke.* 2004; 35(5):1153-1157.
16. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet.* 2003 Feb 15;361(9357):598-604.
17. Chalouhi N, Points L, Pierce GL, Ballas Z, Jabbour P, Hasan D. Localized Increase of Chemokines in the Lumen of Human Cerebral Aneurysms. *Stroke.* 2013; 44(9):2594-2597.
18. Chalouhi N, Hoh BL, Hasan D. Review of Cerebral Aneurysm Formation, Growth, and Rupture. *Stroke.* 2013; 44(12):3613-3622.
19. Chien A, Xu M, Yokota H, Scalzo F, Morimoto E, Salamon N. Nonsphericity Index and Size Ratio Identify Morphologic Differences between Growing and Stable Aneurysms in a Longitudinal Study of 93 Cases. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2018; 39(3):500-506.
20. Cohen-Gadol AA, Spencer DD, Harvey W. Cushing and cerebrovascular surgery: Part I, Aneurysms. *J Neurosurg.* 2004; 101:547–552.
21. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet.* 2003 Mar 8;361(9360):865-872.
22. Dandy W. Intracranial aneurysms of the internal carotid artery cured by operation. *Ann Surg.* 1938; 107:654–659.
23. Darsaut TE, Roy D, Weill A, Bojanowski MW, Chaalala C, Bilocq A, et al. A randomized trial of endovascular versus surgical management of ruptured intracranial aneurysms: Interim results from ISAT2. *Neurochirurgie.* 2019; 65(6):370-376.

24. De Oliveira JG, Beck J, Setzer M, Gerlach R, Vatter H, Seifert V, et al. Risk of shunt-dependent hydrocephalus after occlusion of ruptured intracranial aneurysms by surgical clipping or endovascular coiling: a single-institution series and meta-analysis. *Neurosurgery*. 2007; 61(5):924-33; discussion 933-934.
25. De Rooij NK, Linn FHH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJE. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78(12):1365-1372.
26. De la Torre J, Aliev G. Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25(6): 663-672.
27. Dietmann A, Lackner P, Fischer M, Broessner G, Pfausler B, Helbok R et al. Soluble endoglin and transforming growth factor- β_1 and the development of vasospasm after spontaneous subarachnoid hemorrhage: a pilot study. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 33(1):16-22.
28. Ditz C, Leppert J, Neumann A, Krajewski KL, Gliemroth J, Tronnier VM, et al. Cerebral Vasospasm After Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage: Angiographic Pattern and Its Impact on the Clinical Course. *World Neurosurg*. 2020; 138:913-921.
29. Dolan JM, Kolega J, Meng H. High Wall Shear Stress and Spatial Gradients in Vascular Pathology: A Review. *Ann Biomed Eng*. 2013; 41(7):1411-1427.
30. Dreier JP, Drenckhahn C, Woitzik J, Major S, Offenhauser N, Weber-Carstens S, et al. Spreading ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2013; 115:125-129.
31. Edjlali M, Gentric J-C, Régent-Rodriguez C, Trystram D, Hassen WB, Lion S, et al. Does aneurysmal wall enhancement on vessel wall MRI help to distinguish stable from unstable intracranial aneurysms? *Stroke*. 2014; 45(12):3704-3706.
32. Etminan N, Rinkel GJ. Unruptured intracranial aneurysms: development, rupture and preventive management. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12(12):699-713.
33. Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, Bertsch T, Schmeck J, Schütt S, et al. Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes. *Stroke*. 2000 Dec;31(12):2971-2985.
34. Feigin VL, Rinkel GJE, Lawes CMM, Algra A, Bennett DA, van Gijn J, et al. Risk Factors for Subarachnoid Hemorrhage: An Updated Systematic Review of Epidemiological Studies. *Stroke*. 2005; 36(12):2773-2780.

35. Fernández-Ruiz E, St Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to chromosome 9q34-qter. *Cytogenet Cell Genet.* 1993; 64: 204-207.
36. Findlay JM, Nisar J, Darsaut T. Cerebral Vasospasm: A Review. *Can J Neurol Sci.* 2016; 43(1):15-32.
37. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery.* 1980; 6: 1-9.
38. Foreman PM, Starke RM, Hendrix P, Harrigan MR, Fisher WS Rd, Vyas NA, et al. Endothelin polymorphisms as a risk factor for cerebral aneurysm rebleeding following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clin Neurol Neurosurg.* 2017 Jun;157:65-69.
39. Francis SE, Tu J, Qian Y, Avolio AP. A combination of genetic, molecular and haemodynamic risk factors contributes to the formation, enlargement and rupture of brain aneurysms. *J Clin Neurosci.* 2013;20(7):912-918.
40. Frösen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemelä M, Hernesniemi J, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke.* 2004; 35(10):2287-2293.
41. Galaris G, Montagne K, Thalgott JH, Goujon GJPE, van den Driesche S, Martin S, et al. Thresholds of Endoglin Expression in Endothelial Cells Explains Vascular Etiology in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 19;22(16):8948.
42. García-Ortiz L, Gutiérrez-Salinas J, Guerrero-Muniz S, et al. Aneurismas intracraneales y su comportamiento clínico-genético. *Cirugía y Cirujanos.* 2015; 83(6): 467-472.
43. Gotoh O, Tamura A, Yasui N, Suzuki A, Hadeishi H, Sano K. Glasgow Coma Scale in the prediction of outcome after early aneurysm surgery. *Neurosurgery.* 1996; 39:19-24.
44. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: A balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13:301-307.

45. Graff-Radford NR, Torner J, Adams HP, Jr, Kassell NF. Factors associated with hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. A report of the Cooperative Aneurysm Study. *Arch Neurol.* 1989; 46:744-752.
46. Greving JP, Wermer MJH, Brown RD, Morita A, Juvela S, Yonekura M, et al. Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: a pooled analysis of six prospective cohort studies. *Lancet Neurol.* 2014; 13(1):59-66.
47. Grissenauer C, Starke R, Foreman P, Hendrix P, Harrigan M, Fisher W, et al. Associations between endothelin polymorphisms and aneurysmal subarachnoid hemorrhage, clinical vasospasm, delayed cerebral ischemia, and functional outcome. *J. Neurosurg.* 2018; 128:1311–1317.
48. Gruber DP, Zimmerman GA, Tomsick TA, van Loveren HR, Link MJ, Tew JM. A comparison between endovascular and surgical management of basilar artery apex aneurysms. *J Neurosurg.* 1999; 90:868-874.
49. Guerrero-Muñiz S, Zárate-Méndez A, et al. Aneurismas intracraneales: aspectos moleculares y genéticos relacionados con su origen y desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia.* Nov, 2009; 10(6):453-458.
50. Guglielmi, G, Vinuela, F. Intracranial aneurysms. Guglielmi electrothrombotic coils. *Neurosurg Clin N Am.* 1994; 5:427-435.
51. Hansen-Schwartz J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. Cerebral vasospasm: looking beyond vasoconstriction. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28(6):252-256.
52. He QS, Yang LF, Wang WB, Yuan B, Zhang LY and Guo XJ. Vascular endothelial growth factor gene is associated with hypertensive cerebellar hemorrhage and rehabilitative treatment. *Genet Mol Res.* 2015; 14: 9849-9857.
53. Hendrix P, Foreman P, Starke R, Harrigan M, Fisher, Vyas N, et al. Associations of Endothelin Polymorphisms and Aneurysm Size at Time of Rupture. *World Neurosurgery.* 2018; 102:253-257.
54. Hijdra A, Braakman R, van Gijn J, Vermeulen M, van Crevel H. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Complications and outcome in a hospital population. *Stroke.* 1987; 18:1061-1067.
55. Hippocrates. *The Aphorisms of Hippocrates.* New York: Collins & Co; 1818.

56. Hu X, Fang Y, Li YK, Liu WK, Li H, Ma L, You C. Role of Endoglin Insertion and rs1800956 Polymorphisms in Intracranial Aneurysm Susceptibility: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Nov; 94(45):e1847.
57. Hunt WE, Hess RM. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J Neurosurg*. 1968; 28:14-20.
58. Inagawa T. Risk Factors for Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Review of the Literature. *World Neurosurg*. 2016; 85:56- 76.
59. Ingall T, Asplund K, Mähönen M, Bonita R. A Multinational Comparison of Subarachnoid Hemorrhage Epidemiology in the WHO MONICA Stroke Study. *Stroke*. 2000; 31(5):1054-1061.
60. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*. 2001; 29:306-309.
61. Kaptain GJ, Lanzino G, Kassell NF. Subarachnoid haemorrhage: epidemiology, risk factors, and treatment options. *Drugs Aging*. 2000; 17(3):183-199.
62. Kessler IM, Pacheco YG, Lozzi SP, de Araújo AS Jr, Onishi FJ, de Mello PA. Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*. 2005; 64 Suppl 1:S1:2-5; discussion S1:5.
63. Khurana V, Sohni Y, Mangrun W, McClelland R, O’Kane D, Meyer F, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism. A putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 2003; 34:2555–2559.
64. Jaja BNR, Saposnik G, Lingsma HF, Macdonald E, Thorpe KE, Mamdani M, et al. Development and validation of outcome prediction models for aneurysmal subarachnoid haemorrhage: the SAHIT multinational cohort study. *BMJ*. 2018; 360:5745.
65. Joo SP, Lee JK, Kim TS, Kim MK, Lee IK, Seo BR, et al. A polymorphic variant of the endoglin gene is associated with increased risk for intracranial aneurysms in a Korean population. *Surg Neurol*. 2008 Jul; 70(1):39-44.
66. Juvela S, Poussa K, Porras M. Factors affecting formation and growth of intracranial aneurysms: a long-term follow-up study. *Stroke*. 2001; 32(2):485-491.

67. Juvela S, Poussa K, Lehto H, Porras M. Natural History of Unruptured Intracranial Aneurysms: A Long-term Follow-up Study. *Stroke*. 2013; 44(9):2414-2421.
68. Khurana V, Sohni Y, Mangrun W, McClelland R, O’Kane D, Meyer, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms predict susceptibility to aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2004; 24:291–297.
69. King J.T. Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neuroimaging Clin N Am*. 1997; 7:659-668.
70. Ko N, Rajendran P, Kim H, Rutkowski M, Pawlikowska L, Kwok PY, Young WL. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism (−7867->C) and increased risk of angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2008; 39:1103–1108.
71. Koopman I, Greving JP, van der Schaaf IC, van der Zwan A, Rinkel GJ, Vergouwen MD. Aneurysm characteristics and risk of rebleeding after subarachnoid haemorrhage. *European Stroke Journal*. 2019; 4(2):153-159.
72. Korja M, Silventoinen K, McCarron P, Zdravkovic S, Skytthe A, Haapanen A et al. Genetic epidemiology of spontaneous subarachnoid hemorrhage: Nordic Twin Study. *Stroke*. 2020; 41:2458–2462.
73. Krischek B, Inoue I. The genetics of intracranial aneurysms. *J Hum Genet*. 2006; 51:587–594.
74. Krishna V, Kim DH. Ethnic differences in risk factors for subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2007; 107(3):522-529.
75. Lagares A, Gómez PA, Lobato RD, Alén JF, Alday R, Campollo J. Prognostic factors on hospital admission after spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 2001; 143(7):665-672.
76. Lagares A, Gómez PA, Alén JF, Aríkan F, et al. Hemorragia subaracnoidea aneurismática: guía de tratamiento del Grupo de Patología Vascul ar de la Sociedad Española de Neurocirugía. *Neurocirugía*. 2011; 22:93-115.
77. Lagares D, Rodríguez-Pascuala F, Lamasa S. Papel del eje TGF- β -endotelina 1 en la fibrosis: lecciones del endotelio y el fibroblasto. *Gastroenterol Hepatol*. 2010; 33(Espec Congr 1):90-95.

78. Larsen CC, Astrup J. Rebleeding After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Literature Review. *World Neurosurg.* 2013; 79(2):307-312.
79. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor β 1 on human endothelial vascular cells. *FASEB J* 2000; 14:55-64.
80. Lin Y, Yu H, Song W, Zhang Y, Zhang C, Zhu Y, et al. A variant in the endoglin gene is associated with the development of sporadic intracranial aneurysms. *Curr Neurovasc Res.* 2014; 11(4):294-301.
81. Linn FH, Wijdicks EF, van der Graaf Y, Weerdesteyn-van Vliet FA, Bartelds AI, van Gijn J. Prospective study of sentinel headache in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet.* 1994; 344(8922):590-593.
82. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. *Stroke.* 1996; 27(4):625-629.
83. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Headache characteristics in subarachnoid haemorrhage and benign thunderclap headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; 65(5):791-793.
84. Llana J, Carreño J, Cambor L. Patogenia de los aneurismas. Estevan JM (ed.) *Tratado de aneurismas.* Barcelona, España: J Uriach & CÍA; 1997;71-81.
85. Loan JJM, Wiggins AN, Brennan PM. Medically induced hypertension, hypervolaemia and haemodilution for the treatment and prophylaxis of vasospasm following aneurysmal subarachnoid haemorrhage: systematic review. *Br J Neurosurg.* 2018; 32(2):157-164.
86. Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(5):256-263.
87. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, et al. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol.* 2011 Jul; 10(7):618-625.
88. Maderna E, Corsini E, Franzini A, Giombini S, Pollo B, Broggi G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1/-2 and nitric oxide in unruptured intracranial aneurysms. *Neurol Sci.* 2010 Oct; 31(5):617-623.

89. Malinova V, Schatlo B, Voit M, Suntheim P, Rohde V, Mielke D. Identification of specific age groups with a high risk for developing cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Rev.* 2016; 39(3):429-436.
90. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genet.* 1994; 8:345-351.
91. Meng H, Wang Z, Hoi Y, Gao L, Metaxa E, Swartz DD, Kolega J. Complex hemodynamics at the apex of an arterial bifurcation induces vascular remodeling resembling cerebral aneurysm initiation. *Stroke.* 2007; 38:1924–1931.
92. Meng H, Tutino VM, Xiang J, Siddiqui A. High WSS or Low WSS? Complex Interactions of Hemodynamics with Intracranial Aneurysm Initiation, Growth, and Rupture: Toward a Unifying Hypothesis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014; 35(7):1254-1262.
93. Milinis K, Thapar A, O'Neill K, Davies AH. History of Aneurysmal Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.* 2017 Oct; 48(10):e280-e283.
94. Molyneux AJ, Kerr RSC, Yu L-M, Clarke M, Sneade M, Yarnold JA, et al. International subarachnoid aneurysm trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion. *Lancet.* 2005; 366(9488):809-817.
95. Molyneux AJ, Kerr RS, Birks J, Ramzi N, Yarnold J, Sneade M, et al. Risk of recurrent subarachnoid haemorrhage, death, or dependence and standardised mortality ratios after clipping or coiling of an intracranial aneurysm in the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT): long-term follow-up. *Lancet Neurol.* 2009; 8(5):427-433.
96. Morgagni J. *Sedibus et Causis Morborum per Anatomicos Indagatis.* Venetis, ex typog. Remodiniana. New York, NY: Hafner; 1960:1.
97. Moulin D. Ebers papyrus. *Arch Chir Neerl.* 1961; 12:49–63.
98. Nahed BV, Bydon M, Ozturk AK, Bilguvar K, Bayrakli F, Gunel M. Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* 2018; 60:213–225.
99. Nixon AM, Gunel M, Sumpio BE. The critical role of hemodynamics in the development of cerebral vascular disease. *J Neurosurg.* 2010; 112(6):1240-1253.

100. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 97:2494–2498.
101. Özüm U, Bolat N, Gül E, Özdemir Ö. Endothelial nitric oxide synthase gene [G894T] polymorphism as a possible risk factor in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir*. 2008; 150:57-62.
102. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524–526.
103. Park SH, Yim MB, Lee CY, Kim E, Son E-I. Intracranial Fusiform Aneurysms: It's Pathogenesis, Clinical Characteristics and Managements. *J Korean Neurosurg Soc*. 2008; 44(3):116.
104. Paschoal EHA, Yamaki VN, Teixeira RKC, Paschoal Junior FM, Jong-A-Liem GS, Teixeira MJ et al. Relationship between endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and natural history of intracranial aneurysms: meta-analysis. *Neurosurg Rev*. 2018; 41:87–94.
105. Phan K, Moore JM, Griessenauer CJ, Ogilvy CS, Thomas AJ. Aspirin and Risk of Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2017; 48(5):1210-1217.
106. Pluta RM, Oldfield EH. Analysis of nitric oxide (NO) in cerebral vasospasm after aneurysmal bleeding. *Rev Recent Clin Trials*. 2007 Jan; 2(1):59-67.
107. Pluta RM. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH. *Acta Neurochir Suppl*. 2008; 104:139-147.
108. Qian C, He Y, Li Y, Chen C, Zhang B. Association Between Aspirin Use and Risk of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Meta-analysis. *World Neurosurg*. 2020; 138:299-308.
109. Rawal S, Alcaide-Leon P, Macdonald RL, Rinkel GJE, Victor JC, Krings T, et al. Meta-analysis of timing of endovascular aneurysm treatment in subarachnoid haemorrhage: inconsistent results of early treatment within 1 day. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017; 88(3):241-248.
110. Report of World Federation of Neurological Surgeons Committee on a Universal Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale. *J Neurosurg* 1988; 68:985-986.

111. Rinkel GJE. Intracranial aneurysm screening: indications and advice for practice. *Lancet Neurol.* 2005; 4(2):122-128.
112. Rodriguez RA, Herry C, English SW, Ramsay T, Seely A, Kenny GP, et al. Variability predictors of Vasospasm in Subarachnoid Hemorrhage: A feasibility Study. *Can J Neurol Sci.* 2021; 48(2):226-232.
113. Roy H, Bhardawai S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *Febs Lett.* 2006; 580:2879-2887.
114. Roy-Chaudhury P, Simpson JG, Power DA. Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol.* 1997; 5:55-60.
115. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998; 101:731–736.
116. Ruigrok YM, Buskens E, Rinkel GJ. Attributable risk of common and rare determinants of subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2001; 32(5):1173-1175.
117. Ruigrok YM, Rinkel GJE. Genetics of Intracranial Aneurysms. *Stroke.* 2008; 39(3):1049-1055.
118. Sagrada Biblia. Versión Oficial de la Conferencia Episcopal Española. 2010; 2 Reyes 4:18-37.
119. Sanz-Rodriguez, F, Guerrero-Esteo M, Botella L, Banville D, Vary C, Bernabéu C. Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(31): 32858-32868.
120. Selverstone B, White JCS. A new technique for gradual occlusion of the carotid artery. *Arch neurol psychiat.* 1951; 84:80-84.
121. Shi C, Awad IA, Jafari N, Lin S, Du P, Hage ZA, et al. Genomics of Human Intracranial Aneurysm Wall. *Stroke.* 2009; 40(4):1252-1261.
122. Song MK, Myeong-Kyu K, Kim TS, Joo SP, Park MS, Kim BC, et al. Endothelial nitric oxide gene T-786C polymorphism and subarachnoid hemorrhage in Korean population. *J. Korean Med. Sci.* 2006; 21:922–926.
123. Starke R, Kim G, Komotar R, Hickman Z, Black E, Rosales M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene single-nucleotide polymorphism predicts cerebral

- vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28:1204–1211.
124. Starke RM, Chalouhi N, Ding D, Hasan DM. Potential Role of Aspirin in the Prevention of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis.* 2015; 39(5-6):332-342.
125. Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G, et al. European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovasc Dis.* 2013; 35(2):93-112.
126. Tao L, Hongbin W, Xiushan L, Hong G, Hongyan S, Dongzhou M. Predictive significance of VEGFA variations in intracranial aneurysm. *Int J Clin Exp Med.* 2017; 10(9):13802-13807.
127. Testai FD, Aiyagari V, Hillmann M, Amin-Hanjani S, Dawson G, Gorelick P. Proof of concept: endogenous antiangiogenic factors predict the occurrence of symptomatic vasospasm post subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2011 Dec; 15(3):416-420.
128. Thampatty BP, Sherwood PR, Gallek MJ, Crago EA, Ren D, Hricik AJ, et al. Role of endothelin-1 in human aneurysmal subarachnoid hemorrhage: associations with vasospasm and delayed cerebral ischemia. *Neurocrit Care.* 2011 Aug; 15(1):19-27.
129. Tian H, Ketova T, Hardy D, Xu X, Gao X, Zijlstra A, Blobel GC. Endoglin Mediates Vascular Maturation by Promoting Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Spreading. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Jun; 37(6):1115-1126.
130. Tromp G, Weinsheimer S, Ronkainen A, Kuivaniemi H. Molecular basis and genetic predisposition to intracranial aneurysm. *Ann Med.* 2014; 46:597–606.
131. Tulamo R, Frosen J, Hernesniemi J, Niemela M. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. *J Neurointerv Surg.* 2010; 2(2):120-130.
132. Turjman AS, Turjman F, Edelman ER. Role of Fluid Dynamics and Inflammation in Intracranial Aneurysm Formation. *Circulation.* 2014; 129(3):373-382.
133. Van Gijn J, Rinkel GJE. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain.* 2001; 124(2):249-278.

134. Van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJE. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2007; 369(9558):306-318.
135. Vergouwen MDI, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJE, Wijdicks EF, Muizelaar JP, et al. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke*. 2010; 41(10):2391-2395.
136. Viarasilpa T, Ghosh P, Gidwani S, Lantigua H, De Marchis GM, Panyavachiraporn N, et al. Prognostic Significance of Sentinel Headache Preceding Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg*. 2020; 139:672-676.
137. Villablanca JP, Duckwiler GR, Jahan R, Tateshima S, Martin NA, Frazee J, et al. Natural history of asymptomatic unruptured cerebral aneurysms evaluated at CT angiography: growth and rupture incidence and correlation with epidemiologic risk factors. *Radiology*. 2013; 269(1):258-265.
138. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996; 93: 1493-1495.
139. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011; 10(7):626-636.
140. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett*. 2000 Apr 7; 471(1):45-50.
141. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab*. 2000; 70:241–251.
142. Wardlaw JM, White PM. The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. *Brain*. 2000; 123:205-222.
143. Wiebers DO, Piepgras DG, Meyer FB, Kallmes DF, Meissner I, Atkinson JLD, et al. Pathogenesis, natural history, and treatment of unruptured intracranial aneurysms. *Mayo Clin Proc*. 2004; 79(12):1572-1583.
144. Wilks A. Sanguineous meningeal effusion (apoplexy); spontaneous and from injury. *Guy's Hosp Rep*. 1859; 5:119–127.

145. Wilson CD, Safavi-Abbasi S, Sun H, Kalani MYS, Zhao YD, Levitt MR, et al. Meta-analysis and systematic review of risk factors for shunt dependency after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2017; 126(2):586-595.
146. Wilson JTL, Pettigrew LEL, Teasdale GM. Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the Extended Glasgow Outcome Scale: Guidelines for Their Use. *J Neurotrauma.* 1998; 15(8):573-585.
147. Xie Z, Hu X, Zan X, Lin S, Li H, You C. Predictors of Shunt-dependent Hydrocephalus After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage? A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg.* 2017; 106:844-860.
148. Xu B, Zhan R, Mai H, Wu Z, Zhu P, Liang Y, Zhang Y. The association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and stroke: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019 Mar; 98(11).
149. Yang C, Qi ZY, Shao C, Xing WK, Wang Z. Association between three eNOS polymorphisms and intracranial aneurysms risk: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015 Jan; 94(4):e452.
150. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010; 42(5):420–427.
151. Yasuno K, Bakirciglu M, Low SK et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *PNAS.* 2011; 6(108):19707–19712.
152. Zhang B, Fugleholm K, Day LB, Ye S, Weller RO, Day INM. Molecular pathogenesis of subarachnoid haemorrhage. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35(9):1341-1360.
153. Zhen Xu, Yan-Ning Rui, John P. Hagan, Dong H. Kim. Intracranial Aneurysms: Pathology, Genetics, and Molecular Mechanisms. *Neuromolecular Med.* 2019 Dec; 21(4): 325–343.

ANEXO

I. Datos de casos (pacientes con AI): N° (número de muestra), edad, sexo (M: mujer, H: hombre), presencia de hipertensión, diabetes, dislipemia, consumo de tabaco, alcohol e historia familiar de AI.

N°	Edad	Sexo	Hipertensión	Tabaco	Alcohol	Diabetes	Dislipemia	Hª familiar
1	79	M	Si	No	No	Si	Si	No
2	34	M	No	No	No	No	No	No
3	62	H	Si	No	Si	No	Si	No
4	73	M	Si	No	No	Si	Si	No
5	69	H	Si	Si	Si	No	Si	No
6	76	M	Si	No	No	No	No	No
7	64	M	Si	Si	No	No	Si	No
8	66	H	Si	Si	Si	No	Si	No
9	70	H	Si	Si	Si	No	Si	No
10	67	M	Si	Si	No	No	Si	No
11	53	M	No	No	No	No	No	No
12	73	H	Si	No	Si	No	Si	No
13	55	H	Si	Si	No	No	Si	No
14	44	M	No	No	No	No	No	No
15	3	M	No	No	No	No	No	No
16	58	H	No	No	No	No	Si	No
17	45	M	Si	Si	Si	No	No	No
18	54	M	Si	No	No	No	Si	No
19	80	M	Si	No	No	No	No	No
20	60	M	Si	Si	No	No	No	No
21	49	H	Si	Si	Si	No	Si	No
22	60	M	Si	No	No	No	No	No
23	55	H	Si	Si	No	No	Si	No
24	36	M	Si	No	No	No	No	No
25	70	H	Si	No	No	No	No	No
26	52	H	Si	Si	Si	No	Si	No
27	63	M	Si	No	No	No	No	No
28	49	M	No	No	No	No	No	No
29	69	M	Si	No	No	No	No	No
30	51	M	No	No	No	No	No	No
31	48	H	Si	No	Si	No	No	No
32	64	H	Si	Si	Si	No	Si	No
33	57	H	Si	Si	Si	No	Si	No
34	41	M	No	Si	No	No	No	No
35	31	M	No	Si	No	No	No	No
36	39	M	No	No	No	No	Si	No
37	62	H	Si	Si	Si	No	Si	No
38	55	M	Si	No	No	No	No	No
39	73	H	Si	Si	Si	No	Si	No
40	45	H	Si	No	No	No	No	No
41	74	M	Si	No	No	Si	Si	No
42	79	M	Si	No	No	Si	Si	No
43	78	M	Si	No	No	Si	Si	No
44	64	M	Si	Si	Si	No	Si	No
45	37	H	Si	Si	Si	No	No	No

46	54	H	Si	Si	Si	No	Si	No
47	46	M	Si	Si	Si	No	Si	No
48	72	H	Si	Si	Si	No	Si	No
49	24	M	No	Si	No	No	No	No
50	66	H	Si	Si	Si	No	Si	No
51	48	H	Si	Si	Si	No	Si	No
52	58	M	Si	No	No	No	No	No
53	75	H	Si	Si	Si	Si	Si	No
54	65	H	Si	No	Si	No	Si	No
55	76	M	Si	No	No	No	No	No
56	55	M	Si	No	No	Si	Si	No
57	56	M	Si	No	Si	No	No	No
58	54	M	Si	Si	No	No	No	No
59	79	M	Si	No	No	No	Si	No
60	55	H	Si	No	No	No	No	No
61	63	H	Si	Si	Si	No	Si	No
62	26	H	No	Si	Si	No	No	No
63	51	H	Si	Si	Si	No	Si	No
64	58	M	No	No	No	No	No	No
65	44	H	No	No	No	No	No	No
66	44	H	Si	Si	Si	No	Si	No
67	54	M	No	No	No	No	No	No
68	43	M	Si	Si	No	No	No	No
69	45	M	Si	No	No	No	No	Si
70	48	M	Si	No	No	Si	Si	No
71	44	H	Si	No	No	No	No	No
72	35	M	No	No	No	No	No	No
73	76	M	Si	No	No	No	No	No
74	79	M	Si	No	No	No	Si	No
75	54	M	Si	No	No	No	No	No
76	66	M	No	No	No	No	No	No
77	46	H	Si	No	Si	Si	Si	No
78	63	M	No	No	No	No	No	No
79	74	H	Si	No	Si	No	Si	No
80	62	M	No	No	No	No	No	No
81	55	M	No	Si	No	No	No	No
82	52	M	No	Si	No	No	No	No
83	55	M	Si	No	No	No	No	No
84	60	M	Si	No	No	No	Si	No
85	67	M	Si	No	No	No	Si	No
86	54	M	Si	No	No	No	Si	No
87	56	M	Si	No	No	No	No	No
88	41	H	Si	Si	Si	No	No	No
89	58	M	Si	No	No	No	No	No
90	64	H	Si	Si	Si	No	No	No
91	55	H	Si	No	Si	Si	Si	No
92	71	M	Si	Si	No	No	Si	Si
93	81	M	Si	No	No	No	No	No
94	62	M	No	No	No	No	Si	No
95	71	M	No	No	No	No	No	No
96	52	M	No	No	No	No	No	No
97	66	M	Si	Si	No	No	No	No

98	53	M	No	No	No	No	No	No
99	46	H	No	Si	No	No	No	No
100	62	H	Si	No	No	No	No	No
101	64	M	No	No	No	No	No	No
102	53	M	No	No	No	No	No	No
103	68	M	No	No	No	No	No	No
104	54	M	Si	Si	No	Si	No	No
105	88	M	Si	No	No	No	No	No
106	54	M	No	Si	No	No	No	No
107	75	M	No	Si	No	No	No	No
108	38	M	No	No	No	No	No	No
109	65	M	Si	No	No	No	Si	No
110	58	H	Si	Si	Si	No	Si	No
111	68	H	Si	Si	Si	Si	Si	No
112	63	M	Si	No	No	No	No	No
113	58	M	Si	No	No	No	No	No
114	46	M	Si	No	No	No	No	No
115	47	H	No	Si	No	No	No	Si
116	68	H	Si	No	No	Si	Si	No
117	68	M	Si	No	No	No	Si	No
118	55	M	No	Si	No	No	Si	No
119	63	M	Si	No	No	No	No	No
120	74	H	Si	Si	Si	No	Si	No
121	68	M	No	No	No	No	No	No
122	51	H	Si	No	No	No	Si	No
123	52	H	Si	No	No	No	No	No
124	59	H	Si	No	Si	No	No	No
125	74	H	No	No	No	No	Si	No
126	82	M	No	No	No	No	Si	No
127	48	M	Si	No	No	Si	Si	No
128	69	H	Si	Si	No	No	No	No
129	71	M	Si	Si	No	No	Si	No
130	62	H	Si	No	No	No	No	No
131	58	H	Si	Si	No	No	Si	No
132	70	H	Si	No	No	Si	No	Si
133	60	M	No	Si	No	No	No	No
134	54	H	No	No	No	No	No	No
135	73	H	Si	No	No	No	No	No
136	37	H	No	Si	Si	No	No	No
137	62	M	No	No	No	No	No	No
138	71	H	Si	Si	Si	No	Si	No
139	53	M	Si	No	No	No	No	No
140	73	M	Si	No	No	Si	Si	No
141	57	M	Si	No	No	No	Si	No
142	73	H	Si	No	No	No	No	No
143	47	H	Si	Si	Si	No	No	No
144	76	H	No	Si	No	Si	No	No
145	42	M	No	Si	No	No	No	No
146	41	H	Si	Si	Si	No	No	No
147	65	M	Si	Si	No	No	No	No
148	47	H	Si	No	No	No	No	No
149	71	H	Si	No	No	No	Si	No

150	43	H	Si	Si	No	No	No	No
151	65	M	Si	Si	No	No	Si	No
152	72	M	Si	Si	No	No	Si	No
153	37	M	No	No	No	No	No	No
154	58	H	Si	No	No	No	No	No
155	48	M	Si	No	No	No	No	No
156	73	H	Si	No	No	No	No	No
157	43	H	No	No	No	No	Si	No
158	47	H	Si	No	Si	No	No	No
159	62	H	Si	Si	Si	No	No	No
160	52	H	Si	No	No	No	No	No
161	68	H	No	No	No	No	No	No
162	72	H	No	No	No	No	No	No
163	61	M	No	Si	No	No	No	No
164	56	M	Si	No	No	No	No	No
165	73	H	Si	No	No	No	No	No
166	58	M	No	Si	No	No	No	No
167	62	H	Si	Si	No	No	No	No
168	42	H	Si	Si	Si	No	No	No
169	41	H	Si	Si	No	No	No	No
170	52	M	Si	Si	No	No	No	No
171	63	M	Si	Si	No	No	Si	No
172	70	M	No	No	No	No	No	No
173	57	M	Si	No	No	No	No	No
174	48	H	No	Si	No	No	No	No
175	47	H	No	Si	Si	No	No	No
176	50	M	No	Si	No	No	No	No

II. Datos de casos (pacientes con AI): N° (número de muestra), N° AI (número de aneurismas intracraneales), tamaño (microaneurismas, pequeños-medianos, grandes y gigantes), territorio (circulación anterior o posterior).

N°	N° AI	Tamaño	Territorio
1	1	Peq-Med	Posterior
2	1	Peq-Med	Anterior
3	1	Peq-Med	Anterior
4	1	Peq-Med	Anterior
5	1	Peq-Med	Anterior
6	1	Peq-Med	Anterior
7	1	Peq-Med	Anterior
8	1	Peq-Med	Anterior
9	1	Peq-Med	Anterior
10	1	Peq-Med	Anterior
11	1	Peq-Med	Anterior
12	1	Peq-Med	Anterior
13	1	Peq-Med	Anterior
14	1	Peq-Med	Anterior
15	1	Peq-Med	Anterior
16	1	Peq-Med	Anterior
17	2	Peq-Med	Anterior
18	1	Peq-Med	Posterior
19	1	Peq-Med	Posterior
20	1	Peq-Med	Anterior
21	1	Peq-Med	Anterior
22	1	Peq-Med	Anterior
23	1	Peq-Med	Anterior
24	2	Peq-Med	Anterior
25	1	Peq-Med	Anterior
26	1	Peq-Med	Anterior
27	1	Peq-Med	Posterior
28	2	Peq-Med	Anterior
29	1	Peq-Med	Anterior
30	1	Peq-Med	Anterior
31	1	Peq-Med	Anterior
32	1	Peq-Med	Anterior
33	1	Micro	Anterior
34	1	Peq-Med	Anterior
35	1	Peq-Med	Anterior
36	1	Peq-Med	Anterior
37	1	Peq-Med	Anterior
38	1	Peq-Med	Anterior
39	1	Peq-Med	Anterior
40	2	Gigantes	Anterior
41	1	Peq-Med	Anterior
42	1	Peq-Med	Posterior
43	1	Grandes	Anterior
44	1	Grandes	Posterior
45	1	Peq-Med	Anterior

46	1	Peq-Med	Anterior
47	1	Peq-Med	Anterior
48	1	Peq-Med	Posterior
49	1	Peq-Med	Anterior
50	1	Peq-Med	Anterior
51	2	Peq-Med	Anterior
52	1	Peq-Med	Anterior
53	1	Peq-Med	Anterior
54	2	Peq-Med	Anterior
55	1	Peq-Med	Anterior
56	1	Peq-Med	Anterior
57	1	Peq-Med	Anterior
58	1	Micro	Anterior
59	1	Peq-Med	Anterior
60	1	Peq-Med	Anterior
61	1	Peq-Med	Anterior
62	1	Peq-Med	Anterior
63	1	Peq-Med	Anterior
64	1	Peq-Med	Anterior
65	2	Peq-Med	Anterior
66	1	Peq-Med	Anterior
67	1	Peq-Med	Anterior
68	1	Peq-Med	Anterior
69	1	Peq-Med	Anterior
70	1	Peq-Med	Posterior
71	1	Peq-Med	Anterior
72	2	Peq-Med	Anterior
73	1	Peq-Med	Anterior
74	1	Peq-Med	Anterior
75	1	Peq-Med	Anterior
76	1	Peq-Med	Anterior
77	2	Peq-Med	Anterior
78	1	Grandes	Anterior
79	1	Micro	Anterior
80	1	Peq-Med	Anterior
81	1	Micro	Anterior
82	4	Peq-Med	Anterior
83	3	Peq-Med	Anterior
84	1	Peq-Med	Anterior
85	1	Peq-Med	Anterior
86	1	Peq-Med	Anterior
87	1	Peq-Med	Anterior
88	1	Peq-Med	Anterior
89	1	Micro	Anterior
90	1	Micro	Anterior
91	1	Peq-Med	Anterior
92	3	Peq-Med	Anterior
93	1	Grandes	Anterior
94	1	Peq-Med	Anterior
95	1	Peq-Med	Anterior
96	1	Gigantes	Posterior
97	2	Peq-Med	Anterior

98	2	Peq-Med	Anterior
99	1	Peq-Med	Anterior
100	3	Peq-Med	Anterior
101	1	Peq-Med	Anterior
102	2	Micro	Anterior
103	2	Grandes	Anterior
104	3	Micro	Anterior
105	1	Peq-Med	Anterior
106	1	Peq-Med	Anterior
107	1	Peq-Med	Anterior
108	1	Micro	Anterior
109	2	Peq-Med	Anterior
110	1	Peq-Med	Anterior
111	1	Peq-Med	Anterior
112	1	Peq-Med	Anterior
113	2	Peq-Med	Anterior
114	1	Peq-Med	Anterior
115	2	Peq-Med	Posterior
116	1	Peq-Med	Anterior
117	1	Peq-Med	Anterior
118	1	Peq-Med	Anterior
119	1	Peq-Med	Anterior
120	1	Peq-Med	Anterior
121	1	Peq-Med	Anterior
122	1	Peq-Med	Anterior
123	1	Peq-Med	Anterior
124	2	Peq-Med	Posterior
125	1	Peq-Med	Anterior
126	1	Peq-Med	Anterior
127	1	Peq-Med	Posterior
128	1	Micro	Posterior
129	2	Peq-Med	Anterior
130	1	Peq-Med	Posterior
131	1	Gigantes	Posterior
132	1	Peq-Med	Anterior
133	1	Peq-Med	Anterior
134	1	Micro	Anterior
135	1	Peq-Med	Anterior
136	1	Peq-Med	Posterior
137	3	Micro	Anterior
138	3	Peq-Med	Anterior
139	4	Peq-Med	Anterior
140	1	Peq-Med	Anterior
141	1	Micro	Anterior
142	1	Peq-Med	Anterior
143	1	Peq-Med	Anterior
144	1	Peq-Med	Anterior
145	3	Peq-Med	Anterior
146	1	Peq-Med	Anterior
147	4	Peq-Med	Anterior
148	1	Peq-Med	Anterior
149	1	Peq-Med	Anterior

150	1	Peq-Med	Anterior
151	1	Peq-Med	Anterior
152	1	Peq-Med	Anterior
153	1	Peq-Med	Anterior
154	1	Peq-Med	Anterior
155	1	Peq-Med	Anterior
156	1	Peq-Med	Anterior
157	1	Peq-Med	Anterior
158	1	Peq-Med	Anterior
159	1	Peq-Med	Anterior
160	1	Peq-Med	Anterior
161	1	Peq-Med	Anterior
162	3	Peq-Med	Anterior
163	1	Peq-Med	Anterior
164	2	Peq-Med	Posterior
165	1	Micro	Anterior
166	1	Peq-Med	Anterior
167	1	Gigantes	Posterior
168	1	Peq-Med	Posterior
169	1	Peq-Med	Anterior
170	2	Peq-Med	Posterior
171	1	Peq-Med	Anterior
172	1	Peq-Med	Anterior
173	3	Peq-Med	Anterior
174	1	Peq-Med	Anterior
175	1	Peq-Med	Anterior
176	2	Peq-Med	Anterior

III. Datos de casos (pacientes con AI): N° (número de muestra), diagnóstico (aneurismas rotos (HSAa), incidentales o en forma de cefalea centinela), Hunt y Hess (puntuación en la escala: grados 1, 2, 3, 4, 5 o no procede en caso de AI no rotos), Fisher (puntuación en la escala: grados 1, 2, 3, 4 o no procede en caso de AI no rotos), tratamiento recibido (coils, stent, clipaje o ninguno), pronóstico (sin secuelas, con secuelas o muerte) y desarrollo de vasoespasmos.

N°	Diagnóstico	Hunt y Hess	Fisher	Tratamiento	Pronóstico	Vasoespasmos
1	HSAa	2,0	4,0	Stent	Con secuelas	Si
2	HSAa	1,0	3,0	Coils	Muerte	No
3	HSAa	5,0	4,0	Ninguno	Muerte	No
4	HSAa	5,0	4,0	Coils	Muerte	No
5	HSAa	5,0	4,0	Coils	Muerte	Si
6	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
7	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
8	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
9	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
10	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
11	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
12	HSAa	5,0	4,0	Coils	Muerte	Si
13	HSAa	1,0	3,0	Clipaje	Con secuelas	No
14	Incidental	No procede	No procede	Stent	Con secuelas	
15	HSAa	4,0	4,0	Clipaje	Muerte	No
16	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
17	HSAa	1,0	3,0	Coils	Muerte	Si
18	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
19	HSAa	5,0	4,0	Ninguno	Muerte	No
20	HSAa	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	No
21	HSAa	5,0	4,0	Ninguno	Muerte	Si
22	HSAa	5,0	4,0	Coils	Muerte	No
23	HSAa	1,0	3,0	Coils	Con secuelas	No
24	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	Si
25	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
26	HSAa	4,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
27	HSAa	4,0	4,0	Ninguno	Muerte	Si
28	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
29	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
30	HSAa	1,0	3,0	Clipaje	Sin secuelas	No
31	HSAa	3,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
32	Incidental	No procede	No procede	Stent	Muerte	
33	HSAa	1,0	2,0	Clipaje	Sin secuelas	No
34	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
35	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
36	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
37	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
38	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	Si
39	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
40	HSAa	2,0	4,0	Stent	Sin secuelas	No

41	Incidental	No procede	No procede	Ninguno	Sin secuelas	
42	HSAa	2,0	3,0	Ninguno	Sin secuelas	No
43	Cefalea	No procede	No procede	Ninguno	Con secuelas	
44	Cefalea	No procede	No procede	Ninguno	Con secuelas	
45	HSAa	3,0	4,0	Clipaje	Sin secuelas	No
46	HSAa	5,0	4,0	Ninguno	Muerte	No
47	HSAa	2,0	4,0	Clipaje	Muerte	Si
48	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
49	HSAa	3,0	4,0	Coils	Con secuelas	Si
50	HSAa	1,0	2,0	Clipaje	Sin secuelas	No
51	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	Si
52	HSAa	2,0	3,0	Coils	Con secuelas	No
53	Cefalea	No procede	No procede	Coils	Con secuelas	
54	HSAa	1,0	3,0	Clipaje	Sin secuelas	No
55	HSAa	5,0	4,0	Ninguno	Muerte	No
56	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
57	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
58	HSAa	1,0	3,0	Clipaje	Sin secuelas	No
59	HSAa	5,0	4,0	Ninguno	Muerte	No
60	HSAa	1,0	2,0	Clipaje	Con secuelas	Si
61	HSAa	1,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
62	HSAa	3,0	3,0	Clipaje	Sin secuelas	No
63	HSAa	2,0	3,0	Clipaje	Sin secuelas	No
64	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
65	HSAa	2,0	4,0	Clipaje	Sin secuelas	No
66	HSAa	3,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
67	HSAa	2,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
68	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
69	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
70	HSAa	2,0	4,0	Clipaje	Sin secuelas	No
71	HSAa	4,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
72	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
73	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
74	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
75	HSAa	2,0	3,0	Coils	Muerte	No
76	HSAa	1,0	4,0	Ninguno	Con secuelas	No
77	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
78	Cefalea	No procede	No procede	Coils	Con secuelas	
79	HSAa	5,0	4,0	Stent	Sin secuelas	No
80	HSAa	4,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
81	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
82	HSAa	2,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
83	HSAa	2,0	4,0	Coils	Muerte	Si
84	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
85	Incidental	No procede	No procede	Ninguno	Sin secuelas	
86	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
87	HSAa	5,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
88	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
89	HSAa	1,0	2,0	Clipaje	Sin secuelas	No
90	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
91	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
92	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	

93	Cefalea	No procede	No procede	Ninguno	Con secuelas	
94	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
95	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
96	Cefalea	No procede	No procede	Coils	Con secuelas	
97	HSAa	5,0	3,0	Coils	Con secuelas	No
98	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
99	HSAa	1,0	2,0	Coils	Sin secuelas	No
100	HSAa	5,0	4,0	Coils	Muerte	Si
101	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	Si
102	Incidental	No procede	No procede	Ninguno	Sin secuelas	
103	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
104	HSAa	4,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
105	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
106	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
107	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
108	HSAa	2,0	4,0	Stent	Sin secuelas	No
109	HSAa	1,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
110	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
111	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
112	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
113	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
114	HSAa	1,0	3,0	Coils	Con secuelas	Si
115	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
116	Cefalea	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
117	HSAa	2,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
118	HSAa	2,0	3,0	Coils	Con secuelas	Si
119	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
120	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
121	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
122	HSAa	4,0	3,0	Coils	Con secuelas	No
123	HSAa	3,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
124	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
125	HSAa	2,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
126	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
127	HSAa	2,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
128	HSAa	2,0	3,0	Clipaje	Sin secuelas	No
129	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
130	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
131	Cefalea	No procede	No procede	Stent	Muerte	
132	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
133	HSAa	2,0	2,0	Coils	Sin secuelas	No
134	Incidental	No procede	No procede	Ninguno	Sin secuelas	
135	HSAa	1,0	4,0	Stent	Con secuelas	No
136	HSAa	2,0	4,0	Stent	Sin secuelas	No
137	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
138	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
139	HSAa	1,0	2,0	Coils	Sin secuelas	No
140	Incidental	No procede	No procede	Stent	Con secuelas	
141	HSAa	1,0	3,0	Stent	Sin secuelas	Si
142	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
143	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
144	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No

145	HSAa	2,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
146	HSAa	1,0	2,0	Coils	Sin secuelas	No
147	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
148	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No
149	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
150	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	Si
151	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
152	HSAa	3,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
153	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
154	HSAa	2,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
155	Incidental	No procede	No procede	Clipaje	Sin secuelas	
156	Incidental	No procede	No procede	Ninguno	Sin secuelas	
157	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	Si
158	HSAa	4,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
159	HSAa	4,0	4,0	Clipaje	Con secuelas	No
160	Cefalea	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
161	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
162	Incidental	No procede	No procede	Ninguno	Sin secuelas	
163	Cefalea	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
164	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	Si
165	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
166	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
167	Cefalea	No procede	No procede	Stent	Con secuelas	
168	HSAa	5,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
169	HSAa	1,0	2,0	Coils	Sin secuelas	No
170	Incidental	No procede	No procede	Stent	Sin secuelas	
171	HSAa	2,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
172	HSAa	1,0	4,0	Clipaje	Sin secuelas	No
173	HSAa	2,0	4,0	Coils	Con secuelas	No
174	Incidental	No procede	No procede	Coils	Sin secuelas	
175	HSAa	1,0	4,0	Coils	Sin secuelas	No
176	HSAa	1,0	3,0	Coils	Sin secuelas	No

IV. Datos de casos (pacientes con AI): N° (número de muestra), Genotipos: rs833061(VEGFA), rs2071559 (VEGFR2), rs5370 (Endotelina), rs3739817 (Endoglina) y rs1799983 (eNOS).

N°	VEGFA rs833061	VEGFR2 rs2071559	Endotelina rs5370	Endoglina rs3739817	eNOS3 rs1799983
1	TC	TC	GT	C	GT
2	C	T	GT	C	G
3	C	TC	G	C	GT
4	TC	C	G	C	G
5	TC	C	G	C	GT
6	TC	TC	GT	C	G
7	C	C	G	C	G
8	C	C	GT	C	T
9	C	TC	G	C	GT
10	TC	TC	G	C	GT
11	TC	TC	GT	C	G
12	TC	C	GT	C	GT
13	TC	C	G	C	GT
14	TC	TC	G	C	G
15	TC	TC	G	C	T
16	T	TC	GT	C	T
17	TC	TC	G	C	G
18	T	T	G	C	G
19	TC	TC	G	C	T
20	TC	TC	G	C	GT
21	TC	T	GT	C	GT
22	TC	TC	G	C	GT
23	TC	C	GT	C	G
24	TC	C	G	C	G
25	T	T	G	C	T
26	TC	TC	GT	C	G
27	TC	T	G	C	GT
28	TC	C	GT	C	G
29	TC	C	GT	C	GT
30	TC	C	G	C	GT
31	C	T	G	C	GT
32	C	TC	GT	C	GT
33	TC	TC	G	TC	GT
34	TC	C	G	TC	GT
35	TC	TC	G	C	GT
36	TC	TC	GT	C	GT
37	TC	C	G	C	GT
38	C	TC	G	C	GT
39	C	T	GT	TC	G
40	C	TC	G	C	GT
41	T	T	G	C	G
42	T	TC	G	C	GT
43	T	TC	G	C	GT
44	C	TC	G	C	G

45	C	TC	G	C	G
46	TC	C	G	C	GT
47	C	TC	GT	C	GT
48	TC	C	G	C	T
49	C	TC	T	C	GT
50	TC	TC	GT	C	GT
51	C	T	G	C	GT
52	T	TC	G	CT	GT
53	C	T	T	C	GT
54	C	TC	T	C	GT
55	T	T	G	C	T
56	T	C	GT	CT	G
57	TC	C	GT	C	GT
58	TC	C	GT	C	G
59	C	TC	GT	C	GT
60	TC	TC	G	C	G
61	TC	TC	G	CT	GT
62	C	C	GT	C	G
63	C	T	G	TC	T
64	T	TC	G	C	G
65	T	TC	GT	C	GT
66	T	T	GT	C	G
67	C	T	G	TC	GT
68	T	TC	G	C	G
69	TC	TC	G	C	GT
70	T	C	G	TC	G
71	TC	TC	G	C	G
72	C	C	G	C	G
73	C	T	G	C	GT
74	T	C	G	TC	G
75	TC	C	G	TC	GT
76	C	TC	G	C	GT
77	TC	T	G	C	G
78	C	TC	G	C	GT
79	TC	T	G	C	G
80	C	TC	T	C	G
81	TC	TC	G	C	GT
82	T	T	G	TC	GT
83	TC	T	G	C	GT
84	TC	C	GT	C	GT
85	TC	C	GT	C	T
86	TC	TC	G	C	G
87	C	TC	GT	C	GT
88	T	TC	G	TC	GT
89	TC	TC	G	C	G
90	TC	T	G	C	GT
91	TC	C	G	C	GT
92	T	TC	G	C	GT
93	TC	C	GT	C	G
94	TC	TC	GT	C	GT
95	TC	T	GT	TC	GT
96	TC	TC	G	C	GT

97	C	T	GT	C	GT
98	T	TC	G	TC	GT
99	TC	TC	G	C	G
100	TC	T	GT	C	GT
101	T	TC	G	C	T
102	TC	TC	GT	C	G
103	TC	TC	GT	C	GT
104	TC	TC	G	C	G
105	C	C	GT	C	G
106	TC	C	G	C	GT
107	TC	TC	GT	C	T
108	TC	TC	G	C	G
109	TC	T	GT	TC	GT
110	T	T	GT	C	G
111	TC	TC	G	C	G
112	TC	T	G	C	G
113	T	TC	G	C	G
114	C	TC	GT	C	G
115	TC	TC	G	C	G
116	C	TC	G	C	GT
117	TC	C	C	C	G
118	T	TC	GT	C	G
119	TC	C	GT	C	T
120	TC	C	GT	C	GT
121	TC	T	G	TC	GT
122	C	T	GT	TC	GT
123	TC	TC	G	C	GT
124	T	TC	G	C	G
125	TC	TC	G	C	T
126	TC	T	GT	C	GT
127	T	C	G	TC	G
128	C	TC	T	C	G
129	TC	TC	T	C	GT
130	TC	C	G	C	G
131	T	C	GT	C	T
132	C	C	G	C	T
133	TC	TC	G	TC	GT
134	T	T	G	C	G
135	T	TC	G	C	GT
136	TC	TC	G	C	T
137	C	T	G	C	G
138	TC	TC	GT	C	G
139	C	TC	G	C	G
140	T	TC	G	C	T
141	T	C	T	C	GT
142	TC	T	G	TC	GT
143	TC	TC	GT	C	GT
144	C	T	GT	C	G
145	T	TC	G	TC	GT
146	C	TC	GT	C	G
147	TC	TC	G	C	G
148	T	TC	G	C	G

149	C	TC	G	C	GT
150	T	TC	GT	C	G
151	TC	C	T	C	GT
152	TC	TC	G	C	GT
153	TC	TC	G	C	GT
154	TC	TC	GT	C	G
155	T	TC	GT	C	G
156	TC	C	G	C	G
157	TC	C	GT	C	GT
158	TC	TC	G	C	G
159	C	T	GT	C	G
160	T	C	G	C	T
161	T	TC	GT	C	T
162	T	T	GT	C	T
163	TC	C	G	C	T
164	T	TC	G	C	GT
165	C	TC	G	TC	G
166	TC	TC	G	C	G
167	TC	TC	GT	C	G
168	TC	TC	G	C	T
169	TC	TC	T	C	G
170	C	TC	G	C	G
171	TC	T	G	C	G
172	T	TC	G	TC	GT
173	T	C	G	TC	GT
174	T	TC	GT	C	G
175	TC	TC	GT	C	GT
176	TC	TC	GT	C	G

V. Datos de controles: N° (número de muestra), Genotipos: rs833061 (VEGFA), rs2071559 (VEGFR2), rs5370 (Endotelina), rs3739817 (Endoglina) y rs1799983 (eNOS).

N°	VEGFA rs833061	VEGFR2 rs2071559	Endotelina rs5370	Endoglina rs3739817	eNOS3 rs1799983
1	T	T	G	TC	T
2	T	T	G	TC	T
3	T	T	G	TC	T
4	T	T	G	TC	T
5	T	T	G	TC	T
6	C	C	T	C	T
7	C	C	T	C	T
8	C	C	GT	C	T
9	C	C	GT	C	T
10	C	C	GT	C	T
11	C	TC	GT	C	T
12	C	TC	GT	C	T
13	TC	TC	GT	C	T
14	TC	TC	GT	C	T
15	TC	TC	GT	C	T
16	TC	TC	G	C	T
17	TC	TC	G	C	T
18	TC	TC	G	C	T
19	TC	TC	G	C	T
20	TC	TC	G	C	T
21	TC	TC	G	C	T
22	TC	TC	G	C	T
23	TC	TC	G	C	T
24	TC	TC	G	C	T
25	TC	TC	G	C	T
26	TC	TC	G	C	T
27	TC	TC	G	C	T
28	TC	TC	G	C	T
29	T	TC	G	C	T
30	T	T	G	C	T
31	T	T	G	C	T
32	T	T	G	C	T
33	T	T	G	C	T
34	T	T	G	C	T
35	T	T	G	C	T
36	T	T	G	C	T
37	T	T	G	TC	GT
38	T	T	G	TC	GT
39	T	T	G	TC	GT
40	T	T	G	TC	GT
41	T	T	G	TC	GT
42	T	T	G	TC	GT
43	C	C	T	C	GT
44	C	C	T	C	GT
45	C	C	T	C	GT
46	C	C	T	C	GT
47	C	C	GT	C	GT

48	C	C	GT	C	GT
49	C	C	GT	C	GT
50	C	C	GT	C	GT
51	C	C	GT	C	GT
52	C	C	GT	C	GT
53	C	C	GT	C	GT
54	C	C	GT	C	GT
55	C	TC	GT	C	GT
56	C	TC	GT	C	GT
57	C	TC	GT	C	GT
58	C	TC	GT	C	GT
59	C	TC	GT	C	GT
60	TC	TC	GT	C	GT
61	TC	TC	GT	C	GT
62	TC	TC	GT	C	GT
63	TC	TC	GT	C	GT
64	TC	TC	GT	C	GT
65	TC	TC	GT	C	GT
66	TC	TC	GT	C	GT
67	TC	TC	GT	C	GT
68	TC	TC	GT	C	GT
69	TC	TC	GT	C	GT
70	TC	TC	GT	C	GT
71	TC	TC	GT	C	GT
72	TC	TC	GT	C	GT
73	TC	TC	GT	C	GT
74	TC	TC	GT	C	GT
75	TC	TC	G	C	GT
76	TC	TC	G	C	GT
77	TC	TC	G	C	GT
78	TC	TC	G	C	GT
79	TC	TC	G	C	GT
80	TC	TC	G	C	GT
81	TC	TC	G	C	GT
82	TC	TC	G	C	GT
83	TC	TC	G	C	GT
84	TC	TC	G	C	GT
85	TC	TC	G	C	GT
86	T	TC	G	C	GT
87	T	T	G	C	GT
88	T	T	G	C	GT
89	T	T	G	C	GT
90	T	T	G	C	GT
91	T	T	G	C	GT
92	T	T	G	C	GT
93	T	T	G	C	GT
94	T	T	G	C	GT
95	T	T	G	C	GT
96	T	T	G	TC	G
97	T	T	G	TC	G
98	T	T	G	TC	G
99	T	T	G	TC	G

100	T	T	G	TC	G
101	C	C	T	C	G
102	C	C	T	C	G
103	C	C	T	C	G
104	C	C	T	C	G
105	C	C	T	C	G
106	C	C	T	C	G
107	C	C	T	C	G
108	C	C	GT	C	G
109	C	C	GT	C	G
110	C	C	GT	C	G
111	C	C	GT	C	G
112	C	C	GT	C	G
113	C	C	GT	C	G
114	C	TC	GT	C	G
115	C	TC	GT	C	G
116	C	TC	GT	C	G
117	TC	TC	GT	C	G
118	TC	TC	GT	C	G
119	TC	TC	GT	C	G
120	TC	TC	GT	C	G
121	TC	TC	GT	C	G
122	TC	TC	GT	C	G
123	TC	TC	GT	C	G
124	TC	TC	GT	C	G
125	TC	TC	GT	C	G
126	TC	TC	GT	C	G
127	TC	TC	GT	C	G
128	TC	TC	GT	C	G
129	TC	TC	G	C	G
130	TC	TC	G	C	G
131	TC	TC	G	C	G
132	TC	TC	G	C	G
133	TC	TC	G	C	G
134	TC	TC	G	C	G
135	TC	TC	G	C	G
136	TC	TC	G	C	G
137	TC	TC	G	C	G
138	TC	TC	G	C	G
139	TC	TC	G	C	G
140	TC	TC	G	C	G
141	TC	TC	G	C	G
142	TC	TC	G	C	G
143	TC	TC	G	C	G
144	T	TC	G	C	G
145	T	T	G	C	G
146	T	T	G	C	G
147	T	T	G	C	G
148	T	T	G	C	G
149	T	T	G	C	G
150	T	T	G	C	G