



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
"MANUEL VELASCO SUÁREZ"

PROTEÍNA 14-3-3 COMO MARCADOR PARA REALIZAR PRUEBA
DIAGNÓSTICA DE PACIENTE CON SOSPECHA DE HEMORRAGIA
SUBARACNOIDEA NO TRAUMÁTICA.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA
DR. CHRISTOPHER MADER ALBA

TUTOR DE TESIS
DRA. PETRA YESCAS GOMEZ

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de contenido

PORTADA	1
Tabla de contenido	2
1) RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA	4
La Hemorragia subaracnoidea (HSA)	5
Aspectos Epidemiológicos:	5
Manifestaciones Clínicas:	5
Signos Clínicos de la enfermedad:	7
Diagnostico:	7
La familia de proteínas 14-3-3	13
2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3) HIPÓTESIS	16
4) OBJETIVOS	17
OBJETIVO PRINCIPAL	17
OBJETIVO SECUNDARIO	17
5) JUSTIFICACIÓN	18
6) METODOLOGÍA	20
Diseño	20
Población y muestra	20
Criterios de selección del estudio	20
Variables	21
7) Material y Métodos:	22
Procesamiento de muestra:	23
Medición de proteína total.	23
La cuantificación de proteínas totales se realizará por el método de BCA	23
Método de ácido bicinconínico o BCA	23
Enriquecimiento proteico.	24
Western Blot	24
Electroforesis en gel de Acrilamida	25
8) CONSIDERACIONES ÉTICAS	27
9) CONSIDERACIONES FINANCIERAS	28
10) RESULTADOS	29
11) APORTACION A LA DE SALUD CON EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.	32
12) DISCUSION.	33
13) REFERENCIAS	34
14) APÉDICE 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	38
15) APÉNDICE 2:	39

1) RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA

Antecedentes: La hemorragia subaracnoidea no traumática (HSA) es una patología que afecta aproximadamente a 10.5 por cada 100000 habitante, siendo su causa generalmente lesiones vasculares cerebrales. Las cuales condicionan gran discapacidad, por morbilidad y mortalidad para la **población. El diagnóstico “estándar de oro” actual es la realización de una tomografía y punción lumbar**, procedimientos que requieren de equipo y personal especializado, así como la angiografía diagnóstica.

La proteína 14-3-3 es una familia de proteínas ácidas que se compone de 7 isoformas. Es una proteína de regulación del ciclo celular, crecimiento, diferenciación, supervivencia y apoptosis. Proteína que se ha demostrado aumenta en líquido cefalorraquídeo, cuando existe una lesión neuronal y además se presenta en eritrocitos y plaquetas de sangre periférica en las mismas cantidades que se presenta en el líquido cefalorraquídeo. Por lo conocido de estas proteínas, reflejan el daño de tejido neuronal y es por este medio que se quiere estimar en base a su cuantificación en sangre periférica, el reflejo exacto de la lesión intracerebral. Haciendo de ésta medición un nuevo método diagnóstico y cuantitativo de la HSA.

Objetivo: Determinar la presencia de proteína 14-3-3 en plasma en pacientes con diagnóstico de HSA y demostrar que isoforma de la proteína 14-3-3 se expresa mayoritariamente en la muestra.

Diseño general y metodología: Se recolectará de forma prospectiva, muestra de sangre periférica de pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, cuya sintomatología sea de HSA y se corrobore por criterios diagnósticos establecidos. Simultáneamente se estadificará al paciente por su estado clínico y se seguirá para valorar su evolución y pronóstico. La sangre será procesada para la cuantificación de proteínas totales por el método de BCA, se realizará un enriquecimiento empleando el protocolo de Protein Enrichment Small Capacity Kit. La identificación de las isoformas presentes en la muestra serán semicuantificadas mediante el procedimiento de Western Blot empleando anticuerpos específicos para las diferentes isoformas de proteína 14-3-3.

Resultados:

La Hemorragia subaracnoidea (HSA)

Aspectos Epidemiológicos:

Aproximadamente del 1 al 4% de pacientes que acuden a urgencias por dolor de cabeza, son atribuibles a hemorragia subaracnoidea (HSA), con una incidencia anual de 6 a 8 casos por 10,000 habitantes. Aproximadamente el 80% de los casos se deben a la ruptura de aneurismas cerebrales, por lo que el retraso en su diagnóstico y en su tratamiento representa un riesgo aumentado de resangrado y la discapacidad o muerte como desenlace de esta patología. El reconocimiento oportuno de la hemorragia subaracnoidea es particularmente difícil en los pacientes con resultados de exámenes neurológicos y del estado mental normales y se deben considerar las tasas estimadas de diagnósticos fallidos que oscilan entre el 5% y 12%. (1-3)

La evaluación diagnóstica estándar para la HSA utiliza la tomografía computarizada craneal sin contraste (TC), seguido de la punción lumbar. La mayoría de los casos de hemorragia subaracnoidea se identifican por TC craneal, con sensibilidades reportados desde 93% a 100% si se realiza con las tecnologías de tercera a sexta generación y cuando las imágenes se realizan dentro de las primeras 12 a 24 horas de dolor de cabeza (4).

La HSA, puede tener diferentes causas y la presentación más frecuente es entre los 55 y los 60 años de edad y tan solo el 20% de los casos se presentan entre las edades de 15 a 45 años (3,4). El 30 % de los casos se presenta durante el sueño (3-5). El 50 % de los pacientes presentan datos de alarma de 6 a 20 días antes de la ruptura aneurismática. (3, 6) Solo en el 30 % de los casos la cefalea esta lateralizada al lado del aneurisma. (5)

Se complica al presentar extensión de la hemorragia en regiones: intraparenquimatosa en el 20 a 40% de los casos, irrupción intraventricular en 13 a 28% de los casos o hemorragia subdural en 2 a 5 % de los casos (2,5) .

Suele presentarse con una mayor incidencia en la primavera que en el otoño. Los pacientes mayores de 70 años se presentan con mayor déficit neurológico. (6)

Sus factores de riesgo son: hipertensión, anticonceptivos orales, tabaquismo, uso de cocaína, hábito etílico, cambios de la tensión arterial de forma diurna, embarazo y puerperio. (6,7).

Manifestaciones Clínicas:

Se caracteriza por síntomas de inicio súbito de predominio cefalea, (5) generalmente acompañada de vómito, síncope (apoplejía), dolor de nuca (meningismos) y fotofobia, incluso pérdida del estado de alerta con recuperación espontánea. Puede también presentar déficits neurológicos focales de nervios craneales; por ejemplo: paresia del tercer nervio por compresión aneurismática, que condicione ptosis, diplopía. Dolor lumbar es otro síntoma por irritación de las raíces y meninges. (7,8)

La cefalea es el síntoma más común y se presenta en el 97% de los casos y usualmente es conocida como **“la peor cefalea de la vida del paciente”, “thunderclap” o “cefalea centinela”, que puede desaparecer**, (6-9) incluso sin que el paciente haya sido atendido. Se presenta en un 30 a 60% de los pacientes con HSA. En casos de que la hemorragia sea escasa y recurrente (9), se observara en la tomografía o en la punción lumbar la presencia de sangre. (10,11)

Las causas más comunes de la hemorragia subaracnoidea no traumática o espontánea son: (1,12)

- Ruptura aneurismática (75-80%)
- Malformación arteriovenosa (4-5%)
- Algunas Vasculitis del Sistema nervioso central
- En raras ocasiones tumores
- Disecciones arteriales, carotídeas y vertebrales
- Ruptura de arteria superficial menor
- Ruptura de vaso infundibular
- Coagulopatías y discrasias sanguíneas iatrogénicas.
- Trombosis de los senos dúrales
- Malformaciones arteriovenosas cervicales o torácicas
- Enfermedad de células falciformes
- Apoplejía pituitaria
- Sin causa determinada (14-22%)

El diagnóstico diferencial: (12-14)

- Cefalea paroxística aguda (hasta el 25% de los pacientes con este diagnóstico presenta HSA).
- Migraña Relámpago
- Cefalea orgásmica benigna

Signos Clínicos de la enfermedad:

El paciente puede presentar: meningismos, hipertensión, déficit neurológico focal, afcción de nervios craneales, alteraciones del estado de alerta con obnubilación hasta el coma, hemorragia ocular (15-18)

Los meningismos; se caracterizan principalmente por la presencia de rigidez de nuca, la cual inicia entre las 6 a 24 horas, posterior a la cefalea. Algunos pacientes presentan el signo de Kernig o signos de Brudzinski.

El coma posterior a una hemorragia subaracnoidea; se presenta por una o la combinación de las siguientes causas subyacentes. Incremento de la presión intracraneal, lesión al parénquima cerebral, hidrocefalia secundaria, isquemia difusa, crisis convulsiva, disminución del flujo cerebral. (9-15)

La hemorragia intraocular, puede presentarse en una de tres variantes asociada a la presencia de HSA con una asociación entre un 20 y 40%(16-19)

Hemorragia subhialoidea (pre-retiniana) y se puede observar por fundoscopia en un 11 a 33 % de los casos. Se encuentra cerca del disco óptico y se asocia a mayor mortalidad de los pacientes.

Intra-retiniana (alrededor de la Fóvea) (19)

Hemorragia vitria. También conocida la asociación como síndrome de Terson. Esta variante se presenta generalmente bilateral secundaria al incremento abrupto de la presión intracraneal y está presente en el 4 a 27% de los casos de HSA. Esta variante también presenta mayor riesgo de mortalidad (19,21)

Diagnostico:

Los hallazgos de gabinete y laboratorio:

La evaluación inicial:

- Consta de una tomografía no contrastada de alta definición de cráneo.
- La realización de una punción lumbar en casos no confirmados por tomografía
- La realización de una angiografía cerebral de 4 vasos en caso confirmado o de alta sospecha.

Tomografía: no contrastada de alta definición

Este estudio realiza la detección de una HSA en un 95% de los casos si se realiza en las primeras 48 horas.

La ventaja de la tomografía es que también se puede evaluar las siguientes condiciones: tamaño ventricular (para descartar hidrocefalia) (17,21-26)(complicación que amerita tratamiento quirúrgico de la HSA), hematomas intra-parenquimatosos que condiciones efecto de masa, infartos, cantidad de sangre en las cisternas (para valor pronostico, complicación que amerita tratamiento quirúrgico de la HSA), en el caso de múltiples aneurismas, se podrá valorar cual fue el origen del sangrado, se puede predecir la ubicación del sangrado en un 70% (22,23).

Punción lumbar:

El estudio con mayor sensibilidad y especificidad (con falsos positivos), que puede reducir la presión intracraneal y por lo tanto aumentar el riesgo de resangrado de un aneurisma. Los hallazgos de este estudio en caso de tratarse de una HSA, son incremento de la presión de apertura, la apariencia del líquido con sangre que no forma coagulo, de aspecto xantocrómico, con una cuenta celular de más de 100000 glóbulos rojos, por mm cubico., aumento de proteínas, con normo-glucorraquía (23-26).

La resonancia magnética, no es un buen estudio inicial, por la falta de met-Hb en el sitio de la hemorragia (27).

La angiografía con substracción digital de 4 vasos, es el estándar de oro en la detección de aneurismas, no así de la HSA, incluso valora el vaso espasmo cerebral, para estadificar el riesgo de complicaciones por la misma HSA. (26-28).

Angio-tomografía y angio-resonancia: estos estudios están avanzando rápidamente, y presentan con cada nueva generación de equipo, mayo posibilidad de identificar aneurismas mayores a 3mm (29, 30-32). El abordaje permite seguir el algoritmo que se muestra en la Fig. 1 .

LA HSA se clasifica según su presentación clínica y su presentación radiológica (30-32).

La presentación clínica tiene se evalúa por medio de escalas, de las cuales existen dos aceptadas para **esto. La escala de la "World Federation of Neurosurgery" (WFNS) y la escala de Hunt y Hess (HyH).** Así como una clasificación topográfica, se muestran en las tablas 1 a 4. (1,29,31)

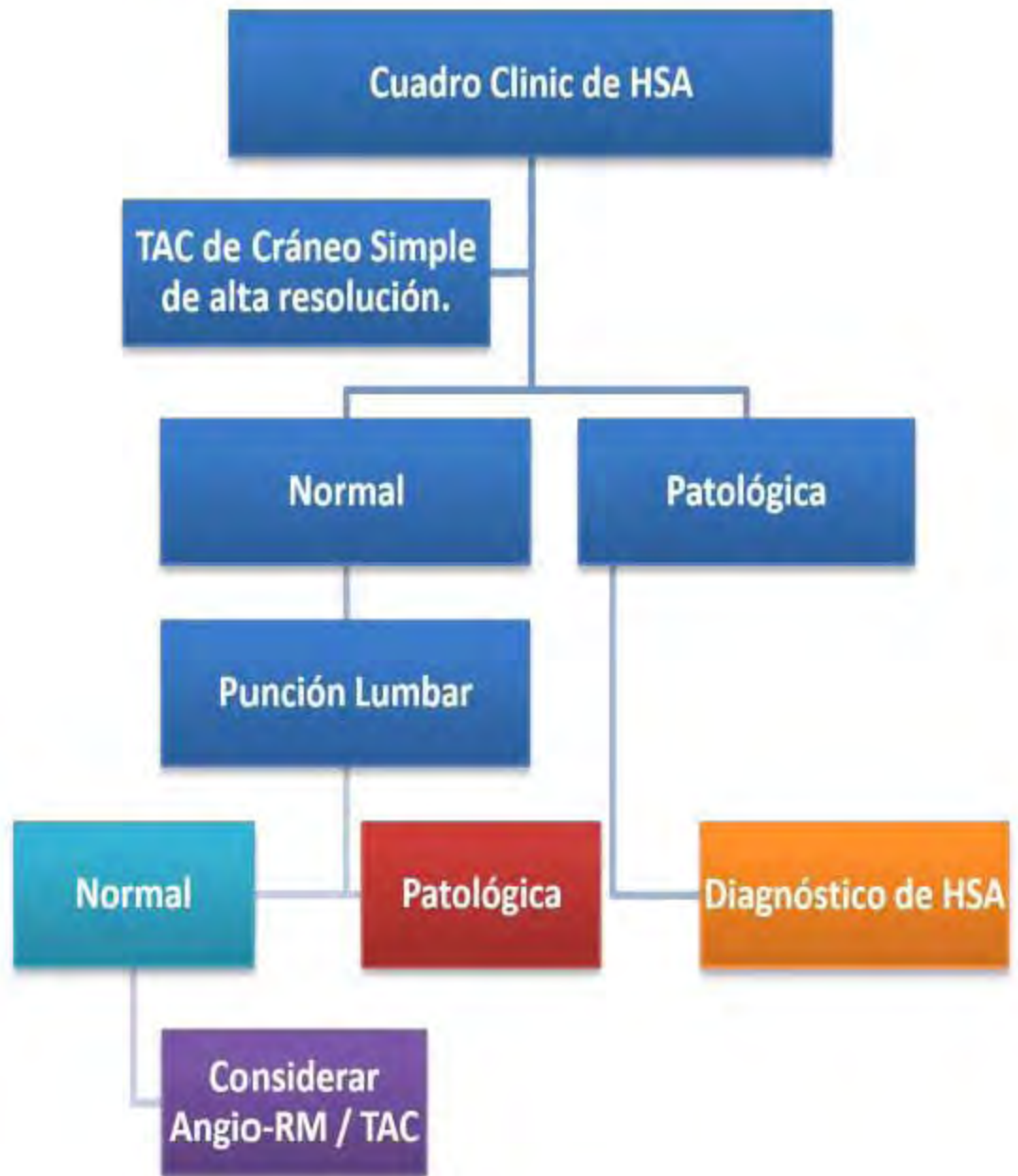


Fig.1. Algoritmo del Diagnóstico de la Hemorragia Subaracnoidea

Tabla 1 y 2. Escala de Hunt y Hess y su relación con mortalidad (29)

Escala de Hunt y Hess		
1	Asintomático o mínima cefalea con leve rigidez de nuca	Preservación del nivel de conciencia (Unidad de ictus)
2	Cefalea severa-moderada con rigidez nucal sin déficit neurológico, salvo a lo sumo, parálisis de pares craneales	
3	Somnolencia, confusión déficit focal leve	Alteraciones del nivel de conciencia (Unidad de cuidados intensivos o Unidad de cuidados neurocríticos)
4	Estupor, déficit motor moderado-severo, signos precoces de descerebración o alteraciones vegetativas.	
5	Coma profundo, rigidez de descerebración, aspecto moribundo	

Morbilidad y Mortalidad Quirúrgica vs Grados Clínicos de Hemorragia Subaracnoidea		
Grado (Hunt y Hess)	Morbilidad %	Mortalidad %
0	0-2	0-2
I	2	2-5
II	7	5-10
III	37	5-10
IV	40	35-60
V	45	50-70

Tabla 3. Escala de WFNS (31-34)

Escala de WFNS	
I	Escala de coma de Glasgow: 15 sin hemiparesia
II	Escala de coma de Glasgow: 13-14 sin hemiparesia
III	Escala de coma de Glasgow: 13-14 con hemiparesia
IV	Escala de coma de Glasgow: 7-12 con o sin hemiparesia
V	Escala de coma de Glasgow: 3-6 con o sin hemiparesia

Tabla 4. Escala de Fisher (30)45

Escala de Fisher	
I	Sin evidencia de sangrado en cisternas ni ventrículos
II	Sangre difusa fina, con una capa < 1mm en cisternas medido verticalmente
III	Coágulo grueso cisterna, >1 mm en cisternas medido verticalmente
IV	Hematoma intraparenquimatoso, hemorragia intraventricular, +/- sangrado difuso

Fisiopatología del daño posterior a la hemorragia subaracnoidea:

Existe un daño mecánico, durante los primeros 60 minutos, hasta que se libera sangre hacia el parénquima cerebral, causando compresión de estructuras anatómicas: Esto produciendo varios efectos como se observa en la figura 3. (45).

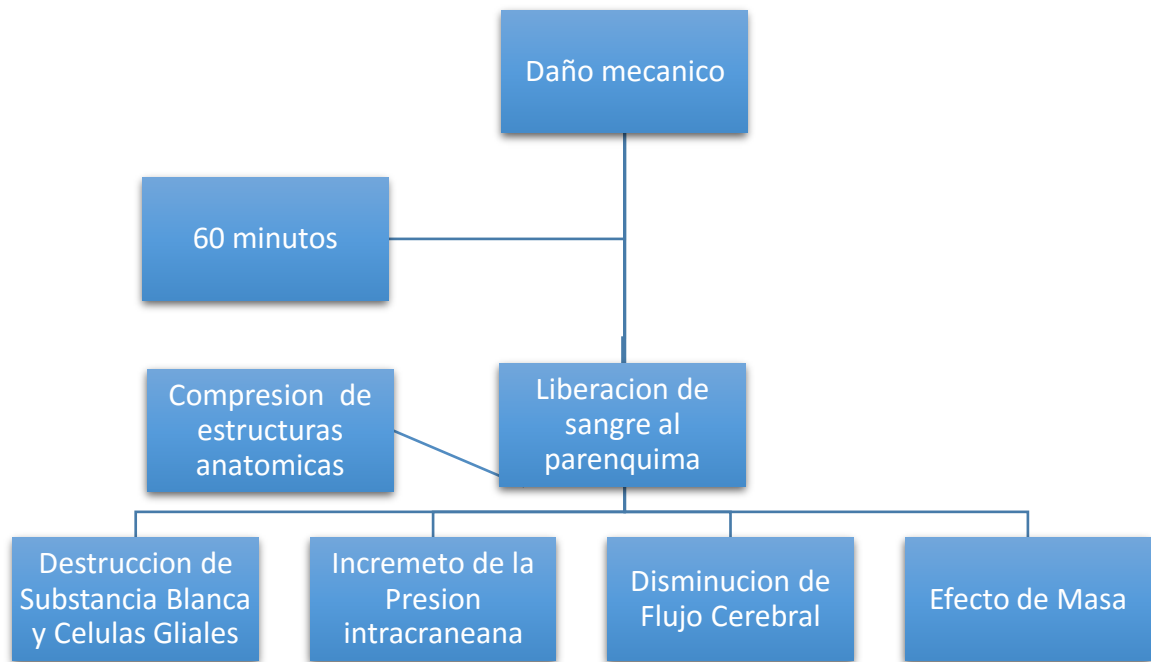


Figura 2. Mecanismo de daño cerebral, a nivel celular y órgano blanco

Estos procesos a su vez desencadenan varias reacciones químicas intra y extracelulares e intra y extra cerebrales, como el estrés oxidativo, la apoptosis y necrosis, la liberación de glutamato, la disrupción de la barrera hemato-encefálica, edema citotóxico y vaso-génico y conllevan a la necrosis de células vecinas.

En respuesta a estas vías metabólicas, se han documentado varios biomarcadores como posibles candidatos para el diagnóstico oportuno de la hemorragia subaracnoidea. Entre los biomarcadores con cambios cuantificables en las primeras horas del inicio de la sintomatología, se encuentran entre los estudiados por diferentes autores, la proteína glial ácida fibrilar (GFAP), el índice S100B/RAGE, APO-CIII, beta-amiloide. Teniendo relevancia clínica hasta ahora solo el índice S100B/RAGE (45). Existen muchos más estudios en relación al pronóstico que al diagnóstico, en relación a la presencia de biomarcadores en relación con la morbi-mortalidad. (46)

El problema del diagnóstico correcto, de una patología tan grave, como visto anteriormente es su variable presentación clínica, desde la presentación de una cefalea hasta la posibilidad de presentarse con deterioro del estado de alerta y coma profundo, es la falla diagnóstica. (49)

Habiendo establecido que casi el 50% de los pacientes presentan un cuadro inicial de cefalea pura (Hunt y Hess 1/2 de WFNS 1, los servicios de urgencias de los diferentes centros de atención de la salud, están sub-diagnosticando la HSA teniendo como primer error en el proceso diagnóstico la falta de obtención de una tomografía y no se realiza el diagnóstico hasta el segundo contacto con el paciente por lo menos el 10% de los pacientes con HSA sin alteraciones del estado de alerta son reenviados a casa, generalmente con el diagnóstico de migraña o cefalea tensional, una vez que se presenta nuevamente al servicio de urgencias de su unidad de salud, con un cuadro más progresivo, por haberse presentado una complicación, como previamente descrita de re-sangrado o vasoespasmos.

Esto condiciona, un peor pronóstico para el paciente ya que como previamente citado, los pacientes que ingresan con el diagnóstico de HSA con peor estado clínico, cuentan con un peor pronóstico general. (49)

Nuevos métodos en protocolos de estudio para el diagnóstico de la HSA:

Está establecido que existen cambios tanto en las proteínas del LCR, así como en la sangre periférica, posterior a la lesión cerebral, estos cambios en concentraciones, se pueden utilizar como biomarcadores para el diagnóstico de la hemorragia subaracnoidea (45-47).

Existe evidencia de que estos biomarcadores son predictivos para estimar complicaciones de la hemorragia subaracnoidea como el vasoespasmos, el infarto cerebral isquémico y el desenlace de los pacientes. (47-48). Por lo que se han tratado de crear paneles de biomarcadores para poder establecer el pronóstico de la HSA, sin embargo, han sido pocos los biomarcadores que presentan una significancia en su estudio para el pronóstico. Uno de estos biomarcadores que se relaciona con la severidad de la hemorragia en la HSA es la proteína 14-3-3 y sus isoformas, que como marcador de daño neuronal. (48)

La familia de proteínas 14-3-3

El descubrimiento de las proteínas 14-3-3 se realizó por Moore y Pretz en 1968, cuando se identificaron en tejido cerebral. El peculiar nombre, 14-3-3, se le dio a esta familia de proteínas debido a su patrón de migración característico en la electroforesis en geles de almidón. Es una familia de proteínas altamente homologas, existen 7 isoformas conocidas en mamíferos nombradas por el alfabeto griego de acuerdo también con su forma de elución, según su fase reversa de alto-desempeño en cromatografía líquida

Proteínas 14-3-3 representan una familia de chaperonas expresadas intracelularmente y son exclusivas de células eucariotas. La familia consta de siete isoformas que presentan más de 50% de homología entre ellas- en su secuencia de aminoácidos- las isoformas son: **beta (β), épsilon (ϵ), gamma (γ), eta (η), tau (τ), zeta (ζ), y sigma (σ).** Las formas originalmente descritas como alfa y delta, son en realidad formas fosforiladas de beta y sigma. La proteína 14-3-3 existe principalmente como un dímero con una masa molecular monomérica de 30 kDa aproximadamente y con un punto isoeléctrico ácido de 4-5. (37-40)

Las proteínas 14-3-3 al ser una familia de proteínas ácidas, son moléculas conservadas que forman homó- y heterodímeros estables (21). Cada monómero consta de un haz de nueve α -hélice antiparalelas y el dímero de la proteína 14-3-3 posee una forma característica de copa con un gran canal al centro que contiene dos ranuras de unión anfipáticas (40). En la Fig. 3 se muestra la estructura de la proteína 14-3-3.

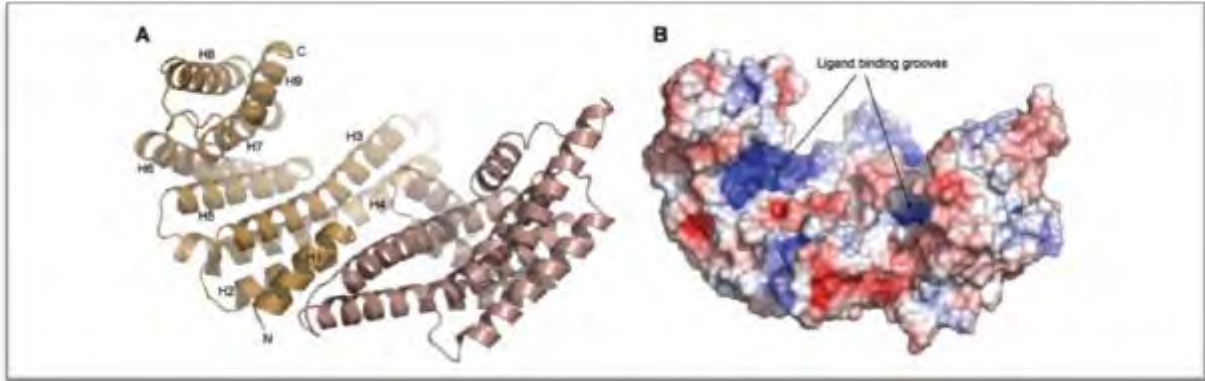


Fig. 3. Estructura de la proteína 14-3-3. En A) la presentación en listón de la estructura de cristal del dímero de la proteína 14-3-3 donde se muestra de diferente color cada monómero, las alfas hélices de cada monómero están marcadas como: H1-H9. B) Superficie molecular del dímero de la proteína 14-3-3, la superficie esta coloreada de acuerdo con el potencial electrostático rango de -6 kT (rojo) a 6 kT (azul). Tomado de Obsilova V, et al 2014 (40)

Las proteínas 14-3-3 fueron descubiertas originalmente como moléculas abundantes en el cerebro y las determinaciones en otros tejidos confirmaron que la concentración más alta de estas proteínas se encuentra en el cerebro. De hecho, las proteínas 14-3-3 comprenden aproximadamente el 1% de la proteína total del cerebro (36, 41).

El papel de las proteínas 14-3-3 ha sido ampliamente estudiado debido a su notable capacidad de afectar a la actividad y la localización de las proteínas sustrato. En las neuronas, las proteínas 14-3-3 funcionan en diversos procesos incluyendo la diferenciación, la migración, la supervivencia, el crecimiento de neuritas, y la regulación de los canales iónicos (42,43). Aunque sus funciones neurofisiológicas no se entienden completamente, las proteínas 14-3-3 han sido implicadas en una serie de trastornos neurológicos.

Estas proteínas, ya sea como homo o heterodímero hacia la región N-terminal forman una "ranura antipática" que les permite interactuar con más de 200 proteínas intracelulares (40-43), a través de interacciones proteína-proteína, la familia 14-3-3 participa en la coordinación de una serie de procesos biológicos, incluyendo el tráfico de proteínas, la señalización celular, y el transporte en el citoesqueleto (42-43).

Muchos aspectos de la función regulatoria de estas proteínas requieren interacciones específicas proteína-proteína para llevar a cabo los procesos bioquímicos exactos y las funciones celulares. Los altamente conservados miembros de la familia de proteínas 14-3-3 permiten mediar estas interacciones a través de la unión a cientos de otras proteínas lo que les proporciona funciones de regulación, desempeñando así un papel clave en muchos procesos celulares. El enlace de la proteína 14-3-3 puede afectar a la función de la proteína diana de diferentes maneras, incluyendo la modulación de su actividad como enzima, su localización subcelular, su estructura y estabilidad, o sus interacciones moleculares.

Principalmente se encuentra de forma intracelular, cuando no interactúa con su ligando y se expresa de forma extracelular al momento de presentar lisis celular. Es en este momento es que se puede cuantificar. (43,44)

Existe el estudio estandarizado para la medición de proteína 14-3-3 en líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico premortem de la encefalopatía espongiiforme conocida como Creutzfeldt-Jakob que pertenece al grupo de enfermedades priónicas. Se incrementa los niveles de la proteína 14-3-3 como causa de la rápida destrucción celular que se presenta en los cerebros de los pacientes con priones. (37)

Esta proteína se ha utilizado como un biomarcadores de complicaciones de la HSA, así como se ha utilizado como medición de severidad de la hemorragia. Sin embargo, no se ha utilizado como un biomarcadores para el diagnóstico oportuno de la lesión cerebral, ya que la presencia de la proteína en su isoforma beta que es exclusiva del cerebro y constituye hasta el 1% de la proteína total del cerebro, su liberación, condicionará su fosforilación y se convertirá en la isoforma zeta. Ambas se pueden medir e incluso realizar un índice entre estas para determinar la presencia de HSA.

2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es un hecho que el retraso en el diagnóstico conlleva a peor pronóstico funcional, ya que las complicaciones que se suscitan como parte del daño secundario de la HSA, son las que más secuela neurológica dejan, siendo estas las ya mencionadas anteriormente el vasoespasmo y el resangrado.

La carencia de poder realizar un diagnóstico oportuna y de forma adecuada o incluso presentar una falla diagnóstica en el primer contacto con el paciente, en instituciones que carecen del soporte de biotecnología requerido en el algoritmo estándar, conlleva a que la HSA sea diagnosticada de forma retardada, con presentaciones de las primeras complicaciones y conlleve a mayor morbilidad y mortalidad. Siendo esta enfermedad de gran impacto para la sociedad y la economía de la población afectada. Su morbilidad genera incapacidad severa a los pacientes, que aparte de dejar de ser productivos para la sociedad se convierten en dependientes de un cuidador.

3) HIPÓTESIS

- I. Ha: Los niveles séricos de proteína 14-3-3 en sus isoformas beta y zeta, en plasma de sangre periférica están relacionados con la presencia de HSA.
- II. Ho: Los niveles séricos de proteína 14-3-3 en sus isoformas beta y zeta, en plasma de sangre periférica no están relacionados con la presencia de HSA.

4) OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la presencia de proteína 14-3-3 en plasma en pacientes con diagnóstico de HSA.

OBJETIVO SECUNDARIO

Determinar la concentración total de proteínas por el método de Bradford.

Identificar la isoforma predominante (isoformas beta, gamma y zeta) mediante Western blot.

5) JUSTIFICACIÓN

La posibilidad de contar con un biomarcador fácil y rápido de realizar, para establecer el diagnóstico de forma más oportuna de la HSA, nos conlleva a la realización de este proyecto, que implica poder establecer el diagnóstico; en casos de difícil diagnóstico, los cuales fueron descritos anteriormente, como cefaleas sin presentar alteraciones del estado de alerta, sintomatología que aplica al 49% de los pacientes cuando llegan al servicio de urgencias. Pacientes en los cuales existe una falla diagnóstica en más del 10% y por lo tanto se obvian los estudios diagnósticos estándar como una tomografía de cráneo. el pronóstico de infartos cerebrales asociados a hemorragia subaracnoidea no traumática con mayor facilidad en cualquier servicio de urgencias, en base a una sencilla toma de muestra de sangre, para así poder ofrecer mejor manejo a los pacientes.

La realización del diagnóstico de HSA requiere de la corroboración por estudios de imagen y laboratorio cuando se tiene la sospecha clínica. Estos estudios de extensión a pesar de ser relativamente accesibles, no siempre están disponibles en varios servicios de urgencias, su pronta realización es necesaria para evitar un retraso en el establecimiento del diagnóstico certero y por lo tanto de su manejo específico, siendo esta patología una urgencia real, que pone en peligro la vida del paciente, así como la función en relación al tiempo de inicio del manejo.

Los procedimientos que pueden requerirse para el diagnóstico de hemorragia subaracnoidea (HSA) consisten en lo siguiente:

- Tomografía computarizada de cráneo con secuencia de angio.
- Angiografía de vasos intracraneanos.
- Panangiografía de 4 vasos.
- Punción Lumbar.

La realización de los estudios antes mencionados tiene como objetivo el establecer dicho diagnóstico, y la información proveniente de estos estudios se complementa con datos clínicos que son vertidos en escalas neurológicas que sirven para estratificar la severidad de la HSA y poder establecer un plan de tratamiento y pronóstico, tal es el caso de la escala de Hunt y Hess y la de la World Federation of Neurological Surgeons (WFNS). La escala de Fisher toma en cuenta el volumen y localización de la sangre vertida producto del ictus por ruptura del aneurisma y está muy en relación con la predicción del vasoespasmo que se pudiera desarrollar en los días subsiguientes al episodio de HSA.

A pesar de los elementos de imagen y clínicos antes mencionados aun no contamos con un estudio de laboratorio accesible, rápido, y sencillo que nos ayude a predecir ni la magnitud de las zonas del daño cerebral por vasoespasmo ni la magnitud del daño neurológico a consecuencia de estos fenómenos.

Es por ello que intentamos realizar un estudio para establecer una prueba diagnóstica en un grupo de pacientes con diagnóstico de HSA en diferentes estadios clínicos e imagenológicos para determinar los niveles de proteína 14-3-3 y encontrar si existe evidencia del incremento de dichos niveles en plasma durante las diferentes etapas del periodo de vasoespasmo y potencial desarrollo de complicaciones cerebrales en estos pacientes. Para así poder realizar el diagnóstico de forma más oportuna.

La implicación de poder establecer un plan terapéutico de forma más protocolizada y oportuna en el manejo de la HSA está ya estandarizado en otro tipo de patologías, como lo es el infarto agudo de miocardio: En el cual se establece el manejo y el riesgo de extensión de lesión, así como gravedad del paciente, y su pronóstico en base a los niveles de enzimas cardíacas y troponinas en plasma, sin descartar los estudios ya existentes para la localización de la lesión (electrocardiograma y angiografía). Es por eso que se disminuyó la falla diagnóstica en el infarto agudo al miocardio, por contar con una prueba rápida y segura que condiciona al médico de primer contacto realizar estudios de extensión.

Hoy en día la cuantificación de la proteína propuesta en este protocolo es tardada y en base a este protocolo no ofrece ningún beneficio al paciente actualmente, pero con los resultados obtenidos es posible elaborar ensayos de inmunológicos de tipo imunoBlot. Estos ya son conocidos para otras patologías, como mencionado anteriormente se utilizan en enfermedades cardíacas, para poder hacer el rápido y oportuno diagnóstico de las mismas. Por lo que se pretende que de este estudio surjan más proyectos de investigación para seguir con la línea de diagnóstico rápido de la HSA

En la revisión de la bibliografía para realizar este proyecto se encontraron varios trabajos que utilizan biomarcadores para establecer severidad y o pronóstico de la HSA, la gran mayoría de estudio del líquido cefalorraquídeo, sin embargo, no se encontró ningún trabajo que proponga el uso de biomarcadores como método diagnóstico rápido en la HSA,

6) METODOLOGÍA

Diseño

Diseño prospectivo, observacional, longitudinal, en dos grupos apareados

Población y muestra

Pacientes que acudan a los servicios de urgencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez".

Tamaño de muestra: En vista al cálculo del tamaño de muestra con base en la incidencia y prevalencia de la patología en la población mexicana se utiliza la fórmula:

$$n = \frac{Z^2(PxQ)}{d^2}$$

Donde n es el tamaño de la muestra, z es la desviación normal, P la prevalencia de la HSA, Q=1-P, d la precisión.

Calculado con una significancia del 5% y una precisión al 5%:

Obtenemos al sustituir:

$$n = \frac{1.96^2(0.01x0.99)}{5^2}$$

N=16 pacientes para obtener una muestra representativa con una precisión de 5% y una significancia del 5%.

Criterios de selección del estudio

Criterios de inclusión, exclusión

A) Criterios de inclusión:

Paciente que ingrese al servicio de urgencias y se establezca el diagnóstico clínico de HSA:

Paciente, quien permita su inclusión al protocolo.

Edad: Mayores de 18 años

B) Criterios de exclusión.

Paciente que decida salir del protocolo.

C) Criterio de eliminación.

Muestra contaminada con sangre o hemolisina o insuficiente para la determinación de proteínas 14-3-3.

Variables

Definición operacional de Variables:

Variable Dependiente:

Paciente con Hemorragia Subaracnoidea

Variable Independiente:

La presencia de Proteína 14-3-3 en plasma de sangre periférica.

Variable	Definición operacional	Definición Conceptual	Instrumento de Medición	Codificación de unidades de medición	Tipo
Demográfica	Edad	Años de edad del paciente	Historia Clínica	Años	Continua
	Genero	Hombre o mujer		Dicotómica	Nominal
	Peso	Medido en Kilogramos			Continua
	Días de evolución	Días posterior a la presencia de inicio de síntomas			Continua
Hemorragia Subaracnoidea	Presencia de lesión cerebral hemorrágica, no traumática.	La presencia de sangre extravasada.	Escala de Fisher por Tomografía Punción Lumbar	Grado I Grado II Grado III Grado IV	ordinal
Hemorragia Subaracnoidea	Presencia de lesión cerebral hemorrágica no traumática	La presencia de sangre extravasada	Tomografía	Volumen	continua
Clínica del Paciente:	Estado neurológico secundario a HSA	La presencia de alteraciones	Escala de Hunt y Hess	HyH 1 HyH 2	ordinal

		de nervios craneales y o alteraciones del estado de alerta	por Historia Clínica	HyH 3 HyH 4 HyH 5	
	Estado neurológico secundario a HSA	La presencia de alteraciones de nervios craneales y o alteraciones del estado de alerta	Escala de la WFNS por Historia Clínica	WFNS I WFNS II WFNS III WFNS IV WFNS V	ordinal
Proteína 14-3-3	Presencia de biomarcador en sangre periférica.	Se encuentra presente y elevada la proteína	Western Blot, por procesamiento de muestra		continua

a) Metodología:

7) Material y Métodos:

Obtener pacientes con sospecha diagnóstica de ingreso con hemorragia subaracnoidea no traumática a quienes se les realice estudio de tomografía de cráneo (simple o contrastada) y/o punción lumbar dependiendo de su clasificación tomográfica de Fisher: 1 con punción lumbar 2,3 y 4 (no requiere de punción lumbar)

Solicitar a los pacientes (o familiares la inclusión al estudio mediante firma de consentimiento informado). Pacientes en quienes se estable el diagnóstico de hemorragia subaracnoidea no traumática, por tomografía o punción lumbar se incluirán al grupo 1 (Grupo de casos)

Individuos sanos sin antecedentes familiares de HSA, no emparentados con el paciente que acepten participar en el estudio previo consentimiento informado se incluirán al grupo 2 (Grupo de controles). Realizar el llenado de cuestionario (Anexo 1), para recopilación de datos.

Se realizará la toma de una muestra de sangre de sangre periférica en tubos vacutainer con anticoagulante ACD (7ml), en pacientes en los que se establece el diagnóstico de hemorragia subaracnoidea no traumática.

Procesamiento de muestra:

Las muestras sanguíneas que se obtengan serán centrifugadas antes de ser usadas y almacenadas a $-70-80^{\circ}\text{C}$, para la obtención de plasma.

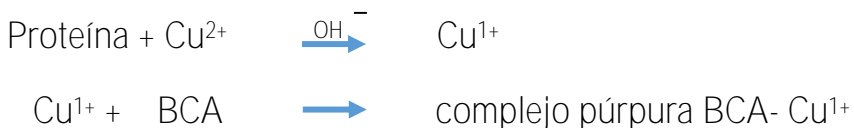
Medición de proteína total.

La cuantificación de proteínas totales se realizará por el método de BCA

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica sin embargo cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta para el diagnóstico de enfermedades existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) para la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. Se empleará el método de BCA (método de derivados colorimétricos) este método tiene como ventaja ser muy sensible y el que muestra menos interferencia para determinación de proteínas.

Método de ácido bicinconínico o BCA

El ácido bicinconínico (BCA), es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino de acuerdo a la reacción que a continuación se muestra:



Fundamento

Se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el BCA (verdoso) para formar un color púrpura-azul y el color formado será proporcional al contenido proteico de la muestra.

Este método analítico permite monitorear a él ion cuproso producto de la reacción y las proteínas en medio. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método sencillo para la cuantificación de proteínas; que además es rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a otros compuestos que afectan la reacción.

El método de BCA requiere crear una curva estándar y se usará como estándar albúmina de suero bovino (BSA) y será necesario realizarla durante cada ensayo. Así la absorbancia de las muestras de los pacientes será determinada su concentración de proteínas por comparación con la curva estándar.

Las muestras se incubarán por 15 min a 60°C y leerán a una absorbancia máxima a 562 nm frente al blanco de reacción.

Enriquecimiento proteico.

Previo a la electroforesis, es importante determinar la concentración total de proteínas presentes en la muestra para asegurar la carga y la cantidad correcta de proteínas en el gel.

Se realizará un enriquecimiento proteico empleando **la tecnología ProteoMiner™** que es una herramienta novedosa para la preparación de las muestras a analizar lo que permitirá obtener el rango dinámico de la concentración de proteínas en muestras biológicas complejas

Las proteínas de alta abundancia presentes en las muestras biológicas complejas como el suero o el plasma, hacen que la detección de proteínas de mediana y baja abundancia sea extremadamente difícil.

La tecnología de enriquecimiento proteico ProteoMiner emplea una gran biblioteca de ligandos peptídicos combinatorios, altamente diversa, que simultáneamente diluye proteínas de alta abundancia y concentra proteínas de baja abundancia. Y se fundamenta en que cuando se aplican muestras biológicas complejas a las columnas que contienen perlas, las proteínas de alta abundancia saturan sus ligandos de alta afinidad y el exceso de proteína es eliminado por lavado. En contraste, las proteínas de abundancia media y baja se concentran en sus ligandos de afinidad específicos. Esto reduce el rango dinámico de las concentraciones de proteínas abundantes, mientras enriquece aquellas de baja abundancia. El procedimiento se realizará de acuerdo a las condiciones establecidas por el manual de procedimientos del estuche comercial ProteoMiner protein enrichment kits (Biorad).

Una vez realizado este enriquecimiento se realizará la determinación de las isoformas de proteína 14-3-3- presentes en la muestra de pacientes comparadas con controles del mismo género y edad de los pacientes por Wester blot.

Western Blot

Se realiza la determinación de la proteína 14-3-3 mediante técnica de Western blot y se seguirá el protocolo basado en el siguiente diagrama:



Fig. 4. Diagrama general del proceso de Western blot.

Electroforesis en gel de Acrilamida

Las proteínas en el extracto se separan de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis en gel de poliácridamida bajo condiciones desnaturalizantes (PAGE). En primer lugar, las proteínas, se revisten con carga negativa, mediante la acción del detergente añadido al gel: Dodecilsulfato de Sodio (SDS), así las proteínas se podrán separar en el gel según su tamaño (SDSPAGE). Se añadirá el colorante de carga (azul de Coomassie) para monitorizar la migración de las muestras durante la electroforesis, así como marcadores de peso molecular conocidos, que se utilizarán para controlar el progreso de la electroforesis y comprobar la eficacia de la posterior transferencia los cuales pueden estar marcados para la detección por fluorescencia.

a. Transferencia electroforética a una membrana Las proteínas serán transferidas electroforéticamente a un soporte rígido o membrana, donde quedarán inmovilizadas. El gel y la membrana (membrana nitrocelulosa), se colocarán entre papel filtro y almohadillas de esponja. Se aplicará voltaje en el tanque de transferencia y las proteínas migrarán desde el gel a la membrana, permitiendo así la hibridación de un anticuerpo que las pueda detectar. La membrana con las proteínas inmovilizadas se procederá a bloquear las zonas con ausencia de proteínas y

así evitar la unión no específica de los anticuerpos, para lo cual se incubará con soluciones a base de proteínas, como leche descremada en polvo. A continuación, se incubará con un anticuerpo primario dirigido contra el epítipo específico de la proteína 14-3-3. Los anticuerpos utilizados son el policlonal de conejo anti-14-3-3 beta, dilución 1: 1000 (Abcam), el policlonal de conejo anti-14-3-3 gamma y el policlonal de conejo anti-14-3-3 zeta y transferrina. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se procederá a la eliminación del excedente mediante tampones de lavado (TBS). Tras varios lavados de la membrana, se adicionará un anticuerpo secundario marcado que se unirá de forma específica al anticuerpo primario, proporcionando una forma de detección.

b. Hibridación y detección.

La hibridación con el anticuerpo secundario permitirá la detección de las bandas. Después del lavado de la membrana para eliminar el anticuerpo no unido, se procede a detectar la localización de la banda de interés en la membrana. Los métodos más comúnmente utilizados para detectar proteínas podrán ser por: Quimioluminiscencia, Fluorescencia y Colorimetría. Para la detección de quimioluminiscencia, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa (HRP); la adición de un sustrato de HRP provoca una reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz. Dicha luz puede ser detectada en una película de rayos X, o de forma digital, mediante un sistema de captación de imágenes. La detección de fluorescencia se basa en la captación de luz emitida por sustancias fluoróforas conjugadas con el anticuerpo secundario.

b) Análisis Estadístico

1.- Se hará una correlación entre los valores obtenidos de la proteína 14-3-3 ya estandarizados y la presencia del evento clínico.

8) CONSIDERACIONES ÉTICAS

La determinación de la proteína 14-3-3, se utiliza como un marcador importante para el diagnóstico de enfermedad de Creutzfeldt- Jacob, por lo que a la fecha no se ha considera que sea de conflicto ético. Sin embargo, consideramos importante que este protocolo sea evaluado para su aprobación ante el Comité de Ética de la Institución. Se realizará únicamente la medición de la proteína en paciente con sospecha clínica de hemorragia subaracnoidea. A todos los participantes se les pedirá consentimiento informado (ver Apéndice 1).

El registro de los pacientes se manejará con estricta confidencialidad, de acuerdo a los principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos de la Declaración de Helsinki, última reunión en Seúl Corea 2008.

9) CONSIDERACIONES FINANCIERAS

- a) Aporte Financiero
Se cuenta con recursos propios del departamento
- b) Recursos con los que se cuenta
Equipo especializado y personal capacitado
- c) Recursos a solicitar
Kit de Enriquecimiento de proteínas
- d) Análisis del costo por paciente
Ninguno para el paciente, costo del estudio por paciente: 1000 PMN

10) RESULTADOS

Se realizó una prueba diagnóstica, de forma, prolectiva, transversal, de casos y controles, realizando un estudio observacional analítico.

Se analizó la muestra de la misma en para establecer la sensibilidad y especificidad, con sus valores predictivos positivos y negativos, para exactitud y precisión de la prueba, calculando la razón de momios y la Chi cuadrada.

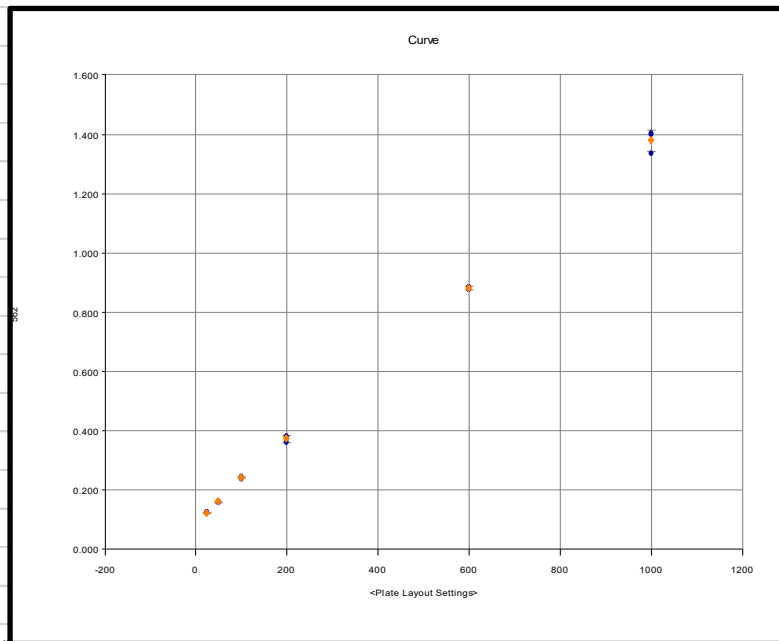
Los resultados que se obtuvieron, son de análisis estadístico, y de confirmación del fenómeno.

Se encontró que la presencia de la HSA_nT, en nuestra población se comparte en la misma relación que la reportara en la literatura 1/3, hombres a mujeres, con una hemorragia Subaracnoidea de Grado 1 de Fisher en menos con una presencia de 0%, Grado 2 de 30%, Grado 3 de 40% y de grado 4 30%.

Se analizó la edad promedio del grupo de casos de 52.9 años con un rango de 32 a 75 años, con el grupo control de 45.6 años con un rango de 18 a 71 años.

Se realizó el Western Blot en todas las muestras posterior a la cuantificación de las proteínas, en las cuales se observó la siguiente curva de resultados.

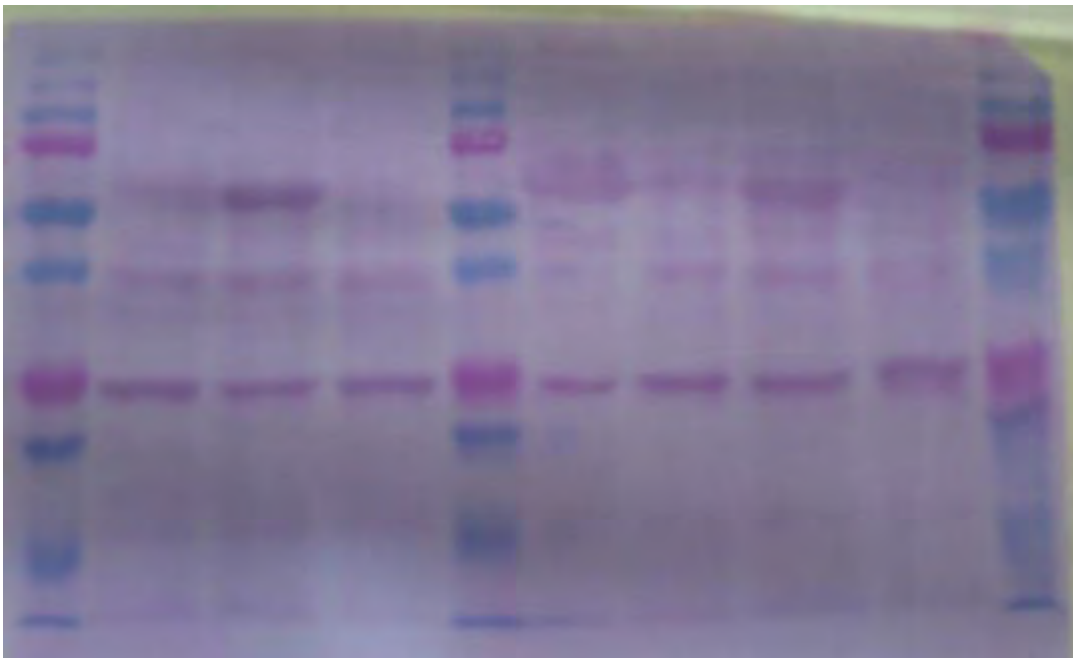
MUESTRA	ug/ml	mg/ml dil
1	642.436	64.24
2	350.322	35.02
3	641.396	64.14
4	583.889	58.4
5	513.553	51.35
6	626.095	62.6
7	242.23	24.22
8	431.456	43.14
9	549.228	54.92
10	535.697	53.57
11	513.553	51.35
12	639.132	63.91
13	469.994	47
Control	720.916	72.1



Esta es la concentración de proteínas por muestras tomando en cuenta factor de dilución

Las concentraciones de las muestras estudiadas, se corrieron en el gel, observando la distribución correcta en la banda de peso molecular, compara con el control.

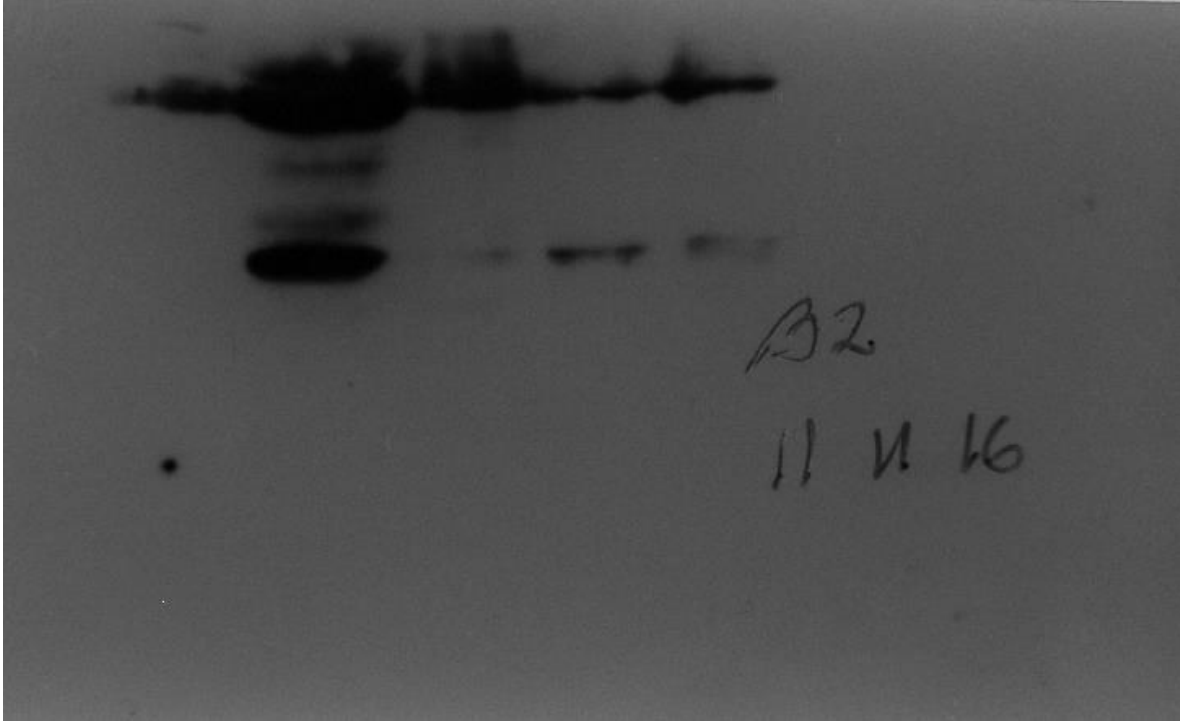
Y posteriormente se realizó el análisis del corrimiento del gel posterior a la transferencia.



Tanto para las proteínas 14-3-3 en sus isoformas beta y gamma.

Obteniendo como resultados, la presencia semicuantitativa de la proteína 14-3-3 con concentración elevada en las muestras de los pacientes casos.

Por lo que se asocia el fenómeno de presentación de elevación de la proteína 14-3-3, en los casos con hemorragia subaracnoidea, comparara con los controles, sanos.



11) APORTACION A LA DE SALUD CON EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

El Diagnostico oportuna de la enfermedad vascular cerebral, de hemorragia subaracnoidea no traumática y así su pronto tratamiento, disminuyendo la morbilidad y la mortalidad de esta entidad patológica, así como disminuirá el costo socio económico de los servicios de salud y socio-familiares, al mejorar el pronóstico del paciente.

12) DISCUSION.

La aportación de la descripción del fenómeno de la presencia de elevación de proteína 14-3-3 en sangre periférica, permite varias cosas:

- A) La elaboración de una línea de investigación completamente nueva, puesto que representa un nuevo equipamiento en el diagnóstico oportuno de una enfermedad catastrófica.
- B) Demostrar que previamente se creía, que no se podían medir fenómenos neurológicos a distancia por la existencia y presencia de la barrera hematoenceflica, haciendo de esto que todas las muestras se tuvieran que realizar por medio de punción lumbar
- C) La elaboración de una medición, por primera vez reportada de la proteína 14-3-3, en México ya que previamente se realizaba la toma de muestra y se enviaba a los EEUU.
- D) La utilización de esta prueba, para el uso en otras entidades neurológicas.

13) REFERENCIAS

1. Connolly et al. Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage : a Guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association: Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage; Stroke, 2012; 43: 1-27
2. Cohen-Gadol AA, Bohnstedt BN. Recognition and evaluation of nontraumatic subarachnoid hemorrhage and ruptured cerebral aneurysm. Am Fam Physician. 2013; 88(7):451-456.
3. Okon M, Adebobola NI, Julius S, Adebimpe O, Taiwo AO, Akinyemi A, Thomas NI. Stroke Incidence and Case Fatality Rate in an Urban Population. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2015: S10523057(14)00547-3.
4. Mark DG, Hung YY, Offerman SR, Rauchwerger AS, Reed ME, Chettipally U, Vinson DR, Ballard DW; Kaiser Permanente CREST Network Investigators. Nontraumatic subarachnoid hemorrhage in the setting of negative cranial computed tomography results: external validation of a clinical and imaging prediction rule. Ann Emerg Med. 2013; 62(1):1-10.
5. Boogaarts HD, van Lieshout JH, van Amerongen MJ, de Vries J, Verbeek AL, Grotenhuis JA, Westert GP, Bartels RH. Aneurysm diameter as a risk factor for pretreatment rebleeding: a meta-analysis. J Neurosurg. 2015; 6:1-8
6. Guo LM, Zhou HY, Xu JW, Wang Y, Qiu YM, Jiang JY. Risk factors related to aneurysmal rebleeding. World Neurosurg. 2011; 76(3-4):292-298.
7. Aguilar MI, Brott TG. Update in intracerebral hemorrhage. Neurohospitalist. 2011;1(3):148-159
8. Broderick JP, Viscoli CM, Brott T, Kernan WN, Brass LM, Feldmann E, Morgenstern LB, Wilterdink JL, Horwitz RI; Hemorrhagic Stroke Project Investigators. Major risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage in the young are modifiable. Stroke. 2003; 34(6):1375-13781.
9. Feldmann E, Broderick JP, Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, Brott T, Morgenstern LB, Wilterdink JL, Horwitz RI. Major risk factors for intracerebral hemorrhage in the young are modifiable. Stroke. 2005; 36(9):1881-1885.
10. Elliott J, Smith M. The acute management of intracerebral hemorrhage: a clinical review. Anesth Analg. 2010; 110(5):1419-1427.
11. Hamdan A, Barnes J, Mitchell P. Subarachnoid hemorrhage and the female sex: analysis of risk factors, aneurysm characteristics, and outcomes. J Neurosurg. 2014; 121(6):1367-1373.

12. Mathon B, Ducros A, Bresson D, Herbrecht A, Mirone G, Houdart E, Saint-Maurice JP, Di Emidio P, George B, Chibbaro S. Subarachnoid and intra-cerebral hemorrhage in young adults: rare and underdiagnosed. *Rev Neurol.* 2014; 170(2):110-118.
13. Lindekleiv H, Sandvei MS, Romundstad PR, Wilsgaard T, Njølstad I, Ingebrigtsen T, Vik A, Mathiesen EB. Joint effect of modifiable risk factors on the risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cohort study. *Stroke.* 2012; 43(7):1885-1889
14. Thomas LE, Czuczman AD, Boulanger AB, Peak DA, Miller ES, Brown DF, Marill KA. Low risk for subsequent subarachnoid hemorrhage for emergency department patients with headache, bloody cerebrospinal fluid, and negative findings on cerebrovascular imaging. *J Neurosurg.* 2014; 121(1):24-31.
15. Martini SR, Flaherty ML, Brown WM, Haverbusch M, Comeau ME, Sauerbeck LR, Kissela BM, Deka R, Kleindorfer DO, Moomaw CJ, Broderick JP, Langefeld CD, Woo D. Risk factors for intracerebral hemorrhage differs according to hemorrhage location. *Neurology.* 2012; 79(23):2275-82.
16. Poisson SN, Glidden D, Johnston SC, Fullerton HJ. Deaths from stroke in US young adults, 1989-2009. *Neurology.* 2014; 83(23):2110-2115.
17. Mensing LA, Ruigrok YM, Greebe P, Vlak MH, Algra A, Rinkel GJ. Risk factors in patients with perimesencephalic hemorrhage. *Eur J Neurol.* 2014; 21(6):816-819.
18. Sung W, Arnaldo B, Sergio C, Juliana S, Michel F. Terson's syndrome as a prognostic factor for mortality of spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89(6):544-547.
19. Stiebel-Kalish H, Turtel LS, Kupersmith MJ. The natural history of nontraumatic subarachnoid hemorrhage-related intraocular hemorrhages. *Retina.* 2004; 24(1):36-40.
20. Jayasekera BA, Deniz K, Pereira EA, Chandra J, Cudlip SA. Terson's syndrome diagnosed by CT. *Br J Neurosurg.* 2012; 26(6):919-920.
21. McCormack RF, Hutson A. Can computed tomography angiography of the brain replace lumbar puncture in the evaluation of acute-onset headache after a negative noncontrast cranial computed tomography scan? *Acad Emerg Med.* 2010; 17(4):444-451.
22. Provenzale JM, Hacin-Bey L. CT evaluation of subarachnoid hemorrhage: a practical review for the radiologist interpreting emergency room studies. *Emerg Radiol.* 2009; 16(6):441-451.
23. Keyrouz SG, Diringer MN. Clinical review: Prevention and therapy of vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Crit Care.* 2007; 11(4):220.
24. Jabbarli R, Gläsker S, Weber J, Taschner C, Olschewski M, Van Velthoven V. Predictors of severity of cerebral vasospasm caused by aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013; 22(8):1332-1339.

25. Inagawa T, Yahara K, Ohbayashi N. Risk factors associated with cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014; 54(6):465-473.
26. Smith ML, Abrahams JM, Chandela S, Smith MJ, Hurst RW, et al. Subarachnoid hemorrhage on computed tomography scanning and the development of cerebral vasospasm: the Fisher grade revisited. *Surg Neurol*. 2005; 63: 229–235.
27. Rosen DS, Macdonald RL. Subarachnoid hemorrhage grading scales: a systematic review *Neurocrit Care*. 2005; 2(2):110-118.
28. Elhadi AM, Zabramski JM, Almefty KK, Mendes GA, Nakaji P, McDougall CG, Albuquerque FC, Preul MC, Spetzler RF. Spontaneous subarachnoid hemorrhage of unknown origin: hospital course and long-term clinical and angiographic follow-up. *J Neurosurg*. 2014; 19:1-8.
29. Ogungbo B. The World Federation of Neurological Surgeons scale for subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*. 2003; 59(3):236-2367.
30. Frontera JA, Claassen J, Schmidt JM, Wartenberg KE, Temes R, Connolly ES Jr, MacDonald RL, Mayer SA. Prediction of symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the modified Fisher scale. *Neurosurgery* 2006; 59:21–27.
31. van Heuven AW, Dorhout Mees SM, Algra A, Rinkel GJ. Validation of a prognostic subarachnoid hemorrhage grading scale derived directly from the Glasgow Coma Scale. *Stroke*. 2008; 39(4):1347-1348.
32. Pegoli M, Mandrekar J, Rabinstein AA, Lanzino G. Predictors of excellent functional outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2015; 122(2):414-418.
33. Chen HI, Stiefel MF, Oddo M, Milby AH, Maloney-Wilensky E, et al. Detection of cerebral compromise with multimodality monitoring in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 2011; 69: 53–63.
34. Goel G, Gupta V, Chinchure S, Gupta A, Kaur G, Jha AN. A decade after International Subarachnoid Aneurysm Trial: Coiling as a first choice treatment in the management of intracranial aneurysms - Technical feasibility and early management outcomes *Asian. J Neurosurg*. 2014; 9(3):137-143.
35. Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:617-647.
36. Berg D, Holzmann C and Riess O: 14-3-3 proteins in the Nervous system; *Nature Reviews, Neuroscience* 2003; 9(4): 752-762 .
37. Sánchez-Valle Díaz R, Graus F, Sáiz-Hinarejos A: Utilización y validez de la prueba de la proteína 14-3-3 en el diagnóstico de enfermedades por Priones: estudio prospectivo de 4 años; *Med Clin*. 2003;120(20):761-764

38. Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, Kido H, Itoyama Y. 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J Clin Neurosci*. 2006; 13(6):661-665.
39. Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguhchi K, Shirabe S, Sata T. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest*. 2010; 90(11):1637-1644.
40. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2011; 22 (7) 663–672.
41. Shimada T, Fournier AE, Yamagata K. Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:534-564.
42. Steinacker P, Aitken A, Otto M. 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2011; 22(7):696-704.
43. Obsilova V, Kopecka M, Kosek D, Kacirova M, Kylarova S, Rezabkova L, Obsil T. Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiol Res*. 2014; 63 Suppl 1:S155-64.
44. Qiao H, Foote M, Graham K, Wu Y, Zhou Y. 14-3-3 proteins are required for hippocampal long-term potentiation and associative learning and memory. *J Neurosci*. 2014; 34(14):4801-4808.
45. Senn A, Elkind M, Montaner J, Chris-Crain M, Katan M. Potential Role of Blood Biomarkers in the Management of Nontraumatic Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovas Dis*. 2014; 38:395-409
46. Chou S., Robertson C.; Monitoring of Cellular Injury and Death in Acute Brain Injury: *Neurocrit VjCare* (2014) 21: S187-S214.
47. Martinez-Morillo E., Garcia Hernandez P. Begcevic I. Kosanam H., Prieto Garcia B. Alvarez Mendez F. Diamendis E; Identification of Novel Biomarkers of Brain Damage in Patients with hemorrhagic Stroke by Integrating Bioinformatics and mass Spectrometry-Based Proteomics; *J proteome Res*: 2014 13: 969-981
48. Siman R. Giovanonne N. Toraskar N. Frangos S. Stein S. Levine J. Kumar M; Evidence that a Panel of Neurodegeneration Biomarkers Predicts Vasoospasm, Infarction, and Outcome in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage; *Plosone*: Decmber 2011, Vol 6 Issue 12 1-9.
49. Kowalski, R. G. (2004). Initial Misdiagnosis and Outcome After Subarachnoid Hemorrhage; *JAMA*, 291 Vol 291, Issue 7 866-874.
50. Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254

14) APÉDICE 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo de Investigación

Fecha: ____/____/____

“Determinación de Niveles de proteína 14-3-3 ”

He sido informado/a que mi familiar tiene diagnóstico clínico de hemorragia subaracnoidea no traumática / espontánea

La proteína a estudiar en el presente proyecto es: proteína 14-3-3 en plasma y LCR.

He sido informado/a que si acepto participar en este estudio se me tomará una muestra de sangre periférica de 5 ml, así como parte de la muestra de LCR tomado transquirúrgico o por punción lumbar, las cual se analizaran en búsqueda de la proteína.

He sido informado/a que mi participación en el estudio es VOLUNTARIA y que, si no acepto participar, no se afectará mi tratamiento y seguimiento en el Instituto.

He sido informado/a que mi participación en el estudio no representa ningún costo para mí.

He sido informado/a que no recibiré remuneración económica por participar en este estudio

He sido informado/a que puedo abandonar el estudio en el momento que yo lo desee.

He sido informado que mis muestras se usarán para esta investigación y para otras en las que se están analizando estas proteínas en la población mexicana.

He leído esta carta cuidadosamente y he decidido participar libre y voluntariamente en el estudio.

Para cualquier duda o aclaración sobre este estudio puede comunicarse con el Dr. Christopher Mader Alba ó con la Dra. Petra Yescas G. al teléfono 56 06 38 22 Ext. 3041 ó 2002, respectivamente. También se puede dirigir con el Dr. Ricardo Colin P, presidente del Comité de Bioética de nuestro Instituto a la extensión 5027.

Nombre del paciente ó familiar _____ Fecha de nacimiento: _____

Lugar de nacimiento y procedencia _____

Dirección _____

Teléfono _____

Responsable legal _____ Firma _____

Parentesco _____

Nombre y firma del 1er. testigo _____

Nombre y firma del 2º testigo _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento _____

Firma _____

15) APÉNDICE 2:

ANEXO 1

Hoja de recopilación de datos:

Paciente:

Edad:

Teléfono:

Domicilio:

Expediente:

Afiliación:

Número Asignado:

Al ingreso:

Sintomatología:

Déficit Neurológico:

Sindromático:

Sitio de hemorragia Subaracnoidea:

Volumen:

	Ingreso	3 día	5 día	7 día	10 día	14 día	21 día	Cirugía	
Glasgow Muestra N°:									
Fisher Muestra N°:									
HyH Muestra N°:									
WFNS Muestra N°:									
P.L. Muestra N°:									

Imagen:

ANEXO 2

Sistema de codificación de muestras:

Asignación de Paciente:

Código: XXX-DD-PP

XXX: Numero continuo asignado al ingresar al paciente al protocolo

DD: número de muestra según el día de toma

01: Día de Ingreso

03, 05, 07, 10, 14, 21 (días de toma)

P: Producto de la Muestra

LP: Líquido Cefalorraquídeo tomado por Punción Lumbar

LC: Líquido Cefalorraquídeo tomado transquirúrgico

P: Plasma



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

Insurgentes Sur 3877
Col. La Fama, C. P. 14269

México, D.F., Tel. 56-06-14-07

<http://www.innn.salud.gob.mx>

México, D. F., a

DR. DANIEL SAN JUAN ORTA
JEFE DEL DEPTO. DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA,
P R E S E N T E.

A fin de cumplir con lo que exige la Ley General de Salud de México, y el Reglamento para Investigación Clínica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, envío a usted:

El protocolo titulado “PROTEÍNA 14-3-3 COMO MARCADOR PARA REALIZAR PRUEBA DIAGNÓSTICO DE PACIENTE CON SOSPECHA DE HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA NO TRAUMÁTICA.

“, **elaborado** de acuerdo al formato oficial, firmado por todos los autores. Original y cuatro copias.

El formato de identificación del ámbito de estudio del protocolo.

Para su evaluación de acuerdo con los Principios Básicos Científicos aceptados en las Declaraciones sobre Investigación Biomédica en seres humanos, de Helsinki II en 1975, Venecia en 1983, Hong Kong en 1989, Sudáfrica 1996, Edimburgo 2000, que señalan textualmente **“el protocolo** se remitirá a un comité independiente del investigador y de la entidad patrocinadora, para consideración, comentarios y **asesoramiento**”, en lo cual se basará la aprobación, en cuyo caso el investigador principal se encargará de la dirección técnica del estudio y tendrá las siguientes atribuciones; cumplir los procedimientos indicados en el protocolo y solicitar autorización para la modificación en los casos necesarios sobre aspectos de ética y bioseguridad, documentar y registrar todos los datos generados durante el estudio en el expediente clínico y su propio archivo sobre el estudio, elaborar y presentar los informes parciales trimestrales y finales de la investigación y comprometerse en generar un producto científico.

A T E N T A M E N T E

Nombre y firma del Investigador Principal

FORMATO DE IDENTIFICACIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO DE LOS PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Título del proyecto:

PROTEÍNA 14-3-3 COMO MARCADOR PARA REALIZAR PRUEBA DIAGNÓSTICO DE PACIENTE CON SOSPECHA DE HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA NO TRAUMÁTICA.

1) Mencione cual es la vinculación de su proyecto de investigación con las líneas de avance médico actual y futuro:

Está vinculado en investigaciones de enfermedad vascular cerebral.

2) Mencione el vínculo de su proyecto con las líneas de interés nacional:

Enfermedad Cerebro-vascular

3) Diga cómo se vincula su investigación con las líneas de interés para la Secretaría de Salud:

Enfermedad Cerebro-vascular

4) Diga cómo se vincula su proyecto con las líneas de interés para el Instituto:

Enfermedad Cerebro-vascular y factores diagnósticos

5) Mencione cuales son las líneas de investigación de interés para usted mismo:

El desarrollo de un nuevo constructo diagnóstico en el algoritmo establecido para la enfermedad cerebro-vascular

Fecha:

Firma del investigador: