



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
TÍTULO DEL PROYECTO DE TESIS:

“Estudio de la expresión en líquido cefalorraquídeo de ocludina, claudina 5 y metaloproteinas 9 como biomarcadores de daño a la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea.”

PROTOCOLO QUE PRESENTA

DR. JOSUE ALEJANDRO CERVANTES GONZALEZ

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROCIRUGIA

ASESORES

DR. RABINDRANATH GARCIA LOPEZ MBNC

DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ MBI



Ciudad de México

Febrero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

IDENTIFICACION DE LOS INVESTIGADORES:

TESISTA:

Dr. Josué Alejandro Cervantes González

*Adscripción: Residente de 5to año de la Especialidad de Neurocirugía en Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades.

*Dirección: Avenida Cuauhtémoc, número 330, Colonia Doctores, Ciudad de México. CP: 06720 México.

Correo electrónico: jossmitz@hotmail.com

TUTORES:

*Nombre: Dr. Rabindranath García López

*Adscripción: Neurocirujano Vascular adscrito a Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades.

*Dirección: Avenida Cuauhtémoc, número 330, Colonia Doctores, Ciudad de México. CP: 06720 México.

Correo electrónico: rabingal@hotmail.com

*Nombre: Dra. Sandra Orozco Suárez

*Adscripción: Investigadora Titular B; adscrita a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades. Mat. 10234055

*Dirección: Avenida Cuauhtémoc, número 330, Colonia Doctores, Ciudad de México. CP: 06720 México.

Correo electrónico: sorozco5@hotmail.com

INVESTIGADORES ASOCIADOS:

Dr. Juan Manuel Gallardo

Adscrito a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades. Mat.

*Dirección: Avenida Cuauhtémoc, número 330, Colonia Doctores, Ciudad de México. CP: 06720 México.

Correo electrónico: jmgallardo@gmail.com

Dr. Marco Antonio Garfias

*Adscripción: Residente de 4to año de la Especialidad de Neurocirugía en Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades

*Dirección: Avenida Cuauhtémoc, número 330, Colonia Doctores, Ciudad de México. CP: 06720 México.

Correo electrónico: marco_garfias16@hotmail.com

Dr. Eduardo Javier Valladares Pérez

*Adscripción: Residente de 3er año de la Especialidad de Neurocirugía en Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades


*Dirección: Avenida Cuauhtémoc, número 330, Colonia Doctores, Ciudad de México. CP: 06720 México.

Correo electrónico: eduardo.javier.valladares@gmail.com

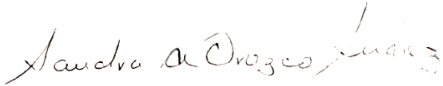
HOJA RECOLECTORA DE FIRMAS


DOCTORA
VICTORIA MENDOZA ZUBIETA
JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION EN SALUD
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI


UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL S. XXI
"DR. BERNARDO SEPULVEDA"
20 ENE 2021
DIRECCION DE EDUCACION
E INVESTIGACION EN SALUD


DOCTOR
BLAS EZEQUIEL LÓPEZ FÉLIX
JEFE DE SERVICIO Y PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD DE NEUROCIRUGIA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI


DOCTOR
RABINDRANATH GARCÍA LÓPEZ
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE NEUROCIRUGIA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI


SANDRA OROZCO SUAREZ
INVESTIGADORA TITULAR B ADSCRITA AL SERVICIO DE INVESTIGACION MEDIA DE
ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

ACTA DEL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACION CON DICTAMEN DE APROBADO

3/8/2020

SIRELCIS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3601.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES Dr. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Registro COFEPRIS 17 CI 09 015 034
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 023 2017082

FECHA Lunes, 03 de agosto de 2020

M.E. RABINDRANATH GARCIA LOPEZ

PRESENTE

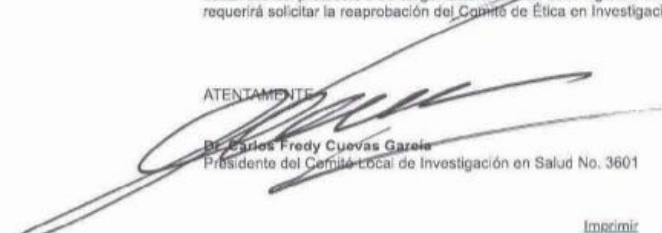
Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título "Estudio de la expresión en líquido cefalorraquídeo de *zona occludens 1*, *claudina 5* y *metaloproteínasa 9* como biomarcadores de daño a la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea" que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**.

Número de Registro Institucional

R-2020-3601-179

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un Informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


Dr. Carlos Frey Cuevas Garcia
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3601

Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SALUD PARA TODOS

AGRADECIMIENTOS

“Recuerda que el Santo Grial es solo para los caballeros perfectos y tú puedes ser uno de ellos”.

Esto me escribieron mis padres hace poco tiempo; mi gratitud hacia ellos y mis 2 hermanos es infinita. Mi mayor honor es formar parte de esta familia.

DEDICATORIAS

Para mis hermanos de armas: Antonio, Flavio Alejandro, Rafael y Juan Pablo.

“Lo que hacemos en vida, resuena en la eternidad”

En este tiempo nos tocó coincidir y luchar juntos.

Para todos los residentes de servicio de neurocirugía; sigan adelante siempre con honor, lealtad, compasión, honestidad, respeto, valor y sobre todo con justicia.

Para todas las personas: estamos a su servicio.

INDICE

	TEMA	PAGINA
1	RESUMEN	8
2	MARCO TEORICO	10
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4	JUSTIFICACION	27
5	PREGUNTA DE INVESTIGACION	28
6	HIPOTESIS	29
7	OBJETIVOS	30
8	PACIENTES Y MÉTODOS	31
8.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	31
9	CRITERIOS DE SELECCIÓN	32
10	DEFINICION DE LAS VARIABLES	33
11	TAMAÑO DE LA MUESTRA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
12	ASPECTOS ÉTICOS	36
13	RESULTADOS	37
14	DISCUSIÓN	46
15	CONCLUSIÓN	49
16	BIBLIOGRAFIA	51
17	ANEXOS	57

Ciudad de México, México 2020.

RESUMEN

Título: Estudio de la expresión en líquido cefalorraquídeo de ocludina, claudina 5 y metaloproteinasa 9 como biomarcadores de daño a la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea.

Antecedentes: La enfermedad cerebrovascular (ECV) es la tercera causa de muerte en países del primer mundo. De todos los tipos de EVC, la hemorragia subaracnoidea (HSA) es responsable de 22% a 29% de la mortalidad. Alrededor de 30% de los pacientes con hemorragia subaracnoidea (HSA) secundaria a ruptura de aneurisma cerebral, desarrollan vasoespasmo arterial y con ello el déficit neurológico asociado aumenta. Esta complicación empeora el pronóstico de los pacientes, puesto que un 25% de ellos mueren y otro 30% a 35% sufren de déficit neurológico permanente. Entonces, el vasoespasmo cerebral es el factor modificable más importante para mejorar la tasa de morbimortalidad en pacientes con hemorragia subaracnoidea secundaria a ruptura de aneurisma. La fisiopatología del vasoespasmo cerebral no es completamente entendida, se carece de un modelo de comportamiento humano en relación con los eventos que ocasionan alteración de la barrera hematoencefálica relacionada íntimamente con la vasculatura intracraneal que conllevan a este desenlace; llevando este contexto general a un contexto específico de la población que se atiende en el Hospital de Especialidades UMAE CMN SXXI, nos preguntamos: ¿Cuál es la expresión en líquido cefalorraquídeo de biomarcadores de disrupción de barrera hematoencefálica?

Objetivos: Identificar y analizar el comportamiento de marcadores biológicos (occludina, Claudina 5 y MMP9) implicados en la disrupción de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática y vasoespasmo.

Material y Métodos: Se obtuvieron muestras de LCR cisternal durante el acto quirúrgico resolutivo de enfermedad aneurismática intracraneana de una cohorte de casos consecutivos de pacientes con enfermedad complicada con hemorragia subaracnoidea y controles con aneurismas no rotos, registrados en el período entre septiembre 2018 a octubre 2019 en el Hospital de Especialidades UMAE 611, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México. Se analizaron dichas muestras para obtener valores de expresión de marcadores biológicos de disrupción de barrera hematoencefálica ocludina, Claudina 5 y MMP 9 tanto en casos como en controles.

Recursos e infraestructura: Servicio de neurocirugía y Unidad de investigación en enfermedades neurológicas de dicho hospital.

Experiencia del grupo: Clínica y experimental en enfermedades neurológicas.

Tiempo para desarrollarse: 1 año.

Palabras clave: *hemorragia subaracnoidea/líquido cefalorraquídeo/occludina/claudina 5/metaloproteinasa 9.*

1. DATOS DEL ALUMNO	
APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO NOMBRE TELEFONO UNIVERSIDAD FACULTAD O ESCUELA CARRERA/ESPECIALIDAD N°. DE CUENTA CORREO ELECTRÓNICO	CERVANTES GONZÁLEZ JOSUÉ ALEJANDRO 9512380357 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE MEDICINA NEUROCIRUGIA 515223015 jossmitz@hotmail.com
2. DATOS DE LOS TUTORES	
TUTOR PRINCIPAL COTUTOR	DR. RABINDRANATH GARCIA LOPEZ Especialista en Neurocirugía Maestría en Investigación, IPN Médico adscrito al módulo de Neurocirugía Vascular, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI Teléfono: 56276900 ext. 21493 E-mail: rabingal@hotmail.com DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ Investigadora titular B Doctorado en investigación Investigadora adscrita al servicio de Investigación Clínica de enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI Teléfono: 56276900 ext. E-mail: sorozco5@hotmail.com
3. DATOS DE LA TESIS	
TÍTULO N°. DE PÁGINAS AÑO NÚMERO DE REGISTRO	<i>Estudio de la expresión en líquido cefalorraquídeo de ocludina, claudina 5 y metaloproteinasa 9 como biomarcadores de daño a la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea</i> 2021 R-2020-3601-179

2.- MARCO TEORICO/ANTECEDENTES:

“Estudio de la expresión en líquido cefalorraquídeo de zónula ocludina, claudina 5 y metaloproteinasa 9 como biomarcadores de daño a la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea”

AUTORES: CERVANTES-GONZALEZ JOSUE A (1), SUAREZ-OROZCO SANDRA (2), GALLARDO JUAN M. (3), GARCIA-LOPEZ RABINDRANATH (4)

(1) RESIDENTE DE NEUROCIRUGIA. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI (HE CMN SXXI)

(2) INVESTIGADORA TITULAR B EN: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

(3) INVESTIGADOR ADSCRITO A: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES NEFROLÓGICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

(4) MEDICO ADSCRITO A: SERVICIO DE NEUROCIRUGIA. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SXXI

I. ANTECEDENTES

I. DEFINICION

Un evento cerebrovascular se define como: evento de rápido desarrollo de signos clínicos focales (en ocasiones globales) de alteración de la función vascular; durando más de 24 horas o llevando a la muerte sin otra causa aparente más que el origen vascular¹.

Los eventos vasculares cerebrales son una etiología de daño cerebral que se ha incrementado en los últimos años, siendo una causa importante de mortalidad y discapacidad en nuestro país^{2,3}. El incremento de eventos cerebrovasculares se asocia a un mayor índice de discapacidad en adultos jóvenes ya que conlleva a una modificación

familiar además de tener un impacto económico significativo para la familia y el sistema de salud, no sólo por la atención requerida, sino también por el proceso de rehabilitación que se debe seguir y en ocasiones por sino también por el proceso de rehabilitación que se debe seguir y en ocasiones por la imposibilidad de reintegrarse a la vida cotidiana.

En la actualidad, los datos obtenidos acerca de la frecuencia de casos de eventos vasculares cerebrales permiten conocer el aumento en la presencia de esta patología.²⁻⁵ Sin embargo, en nuestro país no se conoce la magnitud real del problema ya que no se cuentan con registros nacionales confiables, o bien, debido a que esta patología se enmascara con otros padecimientos que pueden ser condicionantes de la misma. De acuerdo con esta información, es probable que haya muchos casos no registrados por lo que se puede sospechar la presencia de un número mayor de casos, lo que implica a su vez una gran cantidad de casos con alteraciones de tipo cognitivo.

3.1 Hemorragia subaracnoidea

La hemorragia subaracnoidea (HSA) se define como la hemorragia que tiene su origen en el espacio subaracnoideo⁶.

Aneurismas intracraneales: se definen como la dilatación anormal de una arteria intracraneal, generalmente se descubren después de su rotura que ocasiona hemorragia subaracnoidea⁷.

3.2. Vasoespasmo definición y clasificación

El vasoespasmo cerebral es una condición reversible que cursa con reducción del calibre de la luz de una arteria en el espacio subaracnoideo cerebral, con la consiguiente disminución del flujo sanguíneo a las áreas perfundidas por el vaso comprometido⁵.

Se observa fundamentalmente después de HSA aneurismática, pero también se ha relacionado con trauma craneoencefálico y cirugía del área hipotalámico- hipofisaria.

Se aceptan actualmente dos clasificaciones para vasoespasma: angiográfico y sintomático.

2.1. Angiográfico: desde 1951 Ecker y Riemenschneider describen el vasoespasma angiográfico como adelgazamiento de la columna de medio de contraste en las arterias cerebrales mayores². La clasificación angiográfica (Yamamoto) determina el porcentaje de reducción del diámetro del vaso, comparado con el observado en la angiografía inicial. Se denomina vasoespasma grave a un estrechamiento mayor de 75%; moderado de 50% a 75% y leve de 25% a 50%⁵. El vasoespasma angiográfico usualmente inicia del día 3° al 5o de la HSA, se observa la mayor estrechez de la luz arterial desde el día 5 al día 7, y se prolonga en promedio hasta el día 14; se resuelve en el curso de 2 a 4 semanas. Es observado en 30 - 70% de las arteriografías realizadas en el día 7 después de la HSA. Es de notar que, al menos, buena parte del estrechamiento vascular sucede en vasos de pequeño calibre, que no son visibles con angiografía cerebral convencional y que pueden causar parte del compromiso neurológico del paciente.

2. Sintomático: denominado también déficit neurológico tardío o isquemia cerebral diferida, se refiere al síndrome originado por el compromiso isquémico de una región cerebral, por estrechamiento de uno o varios vasos cerebrales, que origina la aparición de un nuevo deterioro del estado de conciencia, afasia o déficit motor. Ha sido asociado con pronóstico neurológico muy pobre en supervivientes de HSA.

Dada la alta frecuencia de esta patología en HSA y la baja tasa de respuesta clínica a las terapias conocidas en la actualidad, el énfasis del tratamiento está no sólo en el diagnóstico temprano sino en la instauración de una terapia profiláctica como parte del manejo, que intente reducir el número de pacientes que desarrollen esta complicación.

La isquemia cerebral diferida se define operativamente como déficit neurológico focal nuevo o disminución del nivel de conciencia, nuevo infarto revelado por tomografía de cráneo de seguimiento, o ambos. Sin embargo, en un consenso de expertos para clarificar la

terminología empleada, se prefirió el término: “Deterioro clínico causado por isquemia cerebral diferida”; el cual se definió de la siguiente manera: la ocurrencia de déficit neurológico focal (como hemiparesia, afasia, apraxia, hemianopsia o negligencia) o disminución de al menos 2 puntos en la escala de coma de Glasgow (ya sea en el puntaje total o en alguno de sus componentes individuales). Este déficit debe durar al menos 1 hora, no es aparente inmediatamente después de la oclusión del aneurisma y no puede ser atribuido a otras causas por medio de la evaluación clínica, tomografía de cráneo o resonancia magnética del cerebro y apropiados estudios de laboratorio⁸.

II. EPIDEMIOLOGIA

La hemorragia subaracnoidea (HSA) corresponde a 6-8% del total de ECV. Tiene una incidencia de 30.000 pacientes por año, y prevalencia mundial de 6 a 16 por 100.000 habitantes; la más alta en países como Finlandia y Japón y ocasiona el 22- 29% de las muertes de causa cerebrovascular⁹. La mortalidad en el primer año de pacientes con vasoespasmo se sitúa entre el 25 y el 50%, un déficit neurológico permanente se observa en otro 15 a 20% y sólo 30-35% tiene una recuperación moderada a buena en un año⁹.

El vasoespasmo cerebral posterior a hemorragia subaracnoidea por ruptura aneurismática es la principal causa de muerte y de déficit neurológico permanente en supervivientes de HSA^{2,9} y, por tanto, es el factor más frecuentemente modificable para mejorar el resultado en este grupo de pacientes. Se describe que 20 a 30% de los pacientes con HSA presentan vasoespasmo sintomático y que aún después de recibir terapia máxima, el 50% desarrollará infarto cerebral, otro 15 a 20% tendrán déficit neurológico permanente o morirán en el primer año de evolución^{4,9}.

En un subestudio del registro RENAMEVASC, se analizaron 231 casos de hemorragia intracraneal asociada a rotura de aneurismas cerebrales, los cuales fueron registrados en un período de 2 años en 25 centros de referencia de tercer nivel de 14 estados del país.

El 85% de los casos tuvieron aneurismas únicos, 15% con aneurismas múltiples, cuyas localizaciones principales fueron: arteria carótida interna en segmento comunicante posterior 28%, arteria comunicante anterior 26%, arteria cerebral media 20%, arteria carótida interna segmento clinideo 12%, segmento oftálmico 6%, y solo el 8% correspondiente a circulación posterior. La frecuencia de resangrado fue de 10.4%, desarrollo de vasoespasmo 37.8% y de hidrocefalia 27.4%¹⁰.

III. FISIOPATOLOGIA

3.3. Fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea

La autorregulación del flujo sanguíneo cerebral está dañada durante los primeros minutos después de la hemorragia subaracnoidea, los valores pico de presión intracraneal se corresponden de forma directa con la cantidad de sangre liberada al espacio subaracnoideo; después del pico de elevación de presión intracraneal (60 segundos aproximadamente) regresa a valores normales o ligeramente elevados, presumiblemente debido a la resistencia de la salida de LCR por la sangre subaracnoidea.^{11,12}

Se han estudiado 2 diferentes patrones de modificación en la presión intracraneana después de un evento de hemorragia subaracnoidea: un incremento rápido seguido por un descenso a condiciones basales en minutos y un incremento sostenido por al menos una hora en promedio (asociado con mayor destructividad en parénquima encefálico).¹³

Las modificaciones que ocurren en el flujo sanguíneo cerebral a los 60 minutos aproximadamente predicen el resultado a las 24 horas (una mortalidad de 100% ocurre

cuando el flujo sanguíneo cerebral cae <40% del nivel basal y existe supervivencia en niveles mayores a 40% en modelos animales).¹² El flujo sanguíneo cerebral alcanza niveles normales a las 48 horas posteriores a hemorragia subaracnoidea.¹⁴

La presión de perfusión cerebral cae de forma profunda durante e inmediatamente después de hemorragia subaracnoidea.^{15,16} Este decremento no es suficiente para causar arresto de la perfusión cerebral.¹⁷

La alteración en la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral posterior a la hemorragia subaracnoidea se asocia con cambios acidóticos en el ambiente cerebral e hidrocefalia, las cuales son observados en la fase aguda de la hemorragia subaracnoidea.^{18,19} La disminución del flujo sanguíneo cerebral no solo se relaciona al incremento de la presión intracraneana sino también a la inyección rápida de solución fisiológica y/o sangre en las cisternas de la base; la cual conlleva la activación del sistema simpático²⁰. También se debe a la actividad vasoconstrictora que la misma sangre genera en la microvasculatura local y a que dicha vasoconstricción puede ser conducida a vasos corriente abajo.^{21,22}

El fenómeno de “no flujo”, que describe la ausencia de llenado vascular después de un período de isquemia global fue propuesto como mecanismo para explicar la reducción de flujo sanguíneo cerebral después de la hemorragia subaracnoidea por Asano en 1977, resulta de una obstrucción de la microcirculación a nivel capilar por viscosidad de la sangre incrementada²³, lesión de la pared vascular, formación de microtrombos, adherencia de granulocitos o agregados plaquetarios. El fenómeno de no-rellenado es una respuesta general de la microcirculación a un período de isquemia^{24,25}.

Los vasos cerebrales mayores (Carótida interna y Arteria comunicante anterior) se constriñen inmediatamente (en lapso de una hora) después de hemorragia subaracnoidea experimental (modelos animales) ²⁶. En humanos se ha observado constricción microvascular aguda (50-300 micrometros) que puede no ser detectada con angiografía

convencional²⁷. Después de 24 horas se expresan en membrana endotelial de paredes vasculares cerebrales moléculas de adhesión (Intercelular, E-Selectina y molécula de adhesión de células vasculares) que correlacionan con desarrollo de vasoespasma diferido (ratas)²⁸. Se incrementa su expresividad en transcurso de 72 horas²⁹. Se generan agregados plaquetarios y la pérdida de colágeno IV de la lámina basal³⁰ (su pérdida genera alteraciones del tono vascular y la presión intravascular) se establecen minutos a horas después de la hemorragia subaracnoidea^{31,32}. Esto incrementa la permeabilidad de la microvasculatura lo cual también correlaciona con el desarrollo de vasoespasma diferido (isquemia cerebral tardía). Las metaloproteinasas de matriz (especialmente MMP-2,-3 y-9), activadores de plasminógeno y proteasas de serina y urocinasa están involucradas en la degradación del colágeno. Su fuente de producción son la microglía, los astrocitos y células endoteliales³³.

Los mecanismos de lesión isquémica aguda después de hemorragia subaracnoidea son procesos multifactoriales, caracterizados por lesiones primarias que involucran cambios agudos en presión intracraneana y presión de perfusión cerebral y cambios en flujo sanguíneo cerebral, constricción vascular, obstrucciones intraluminales y proceso isquémico secundario que incluye respiración celular anaeróbica, depleción de energía, alteración de síntesis proteica, excitotoxicidad, daño por radicales libres, estrés neuronal, daño a DNA, apoptosis y necrosis³⁴.

La neuroinflamación es el componente principal de la lesión cerebral temprana y está formada por varios componentes, como reacciones celulares en términos de activación de la microglía, inducción de citoquinas y quimiocinas, interacciones leucocito-endotelio, modulación de expresión de receptores. Existen además otras reacciones fisiopatológicas como microtrombosis, despolarización cortical extendida, microvasoespasma y disrupción

de la barrera hematoencefálica, resultando todas ellas en disfunción de la microcirculación cerebral.³⁵

La isquemia cerebral tardía relacionada con el vasoespasma cerebral ocurre en 30% de los pacientes con hemorragia subaracnoidea en los 2 primeras semanas de la misma.³⁶

Los indicativos bioquímicos de isquemia cerebral aguda incluyen alteración de la respiración mitocondrial (modelos animales)³⁷, cambio a metabolismo anaeróbico(modelos animales)³⁸, liberación masiva de glutamato extracelular (comprobable mediante microdiálisis)³⁹; se incrementa el índice de concentración de lactato a piruvato en LCR indicando hipoxia tisular⁴⁰. Los marcadores moleculares incluyen la expresión de genes tempranos C-jun, c-fos⁴¹, hemo-oxigenasa 1 y proteína de choque térmico -70 a las 24 horas de la hemorragia subaracnoidea⁴² (representan estrés neuronal que se manifiesta posteriormente como necrosis o apoptosis)⁴³.

Los indicativos histológicos de daño neuronal agudo se manifiestan en 48 horas e incluyen necrosis de capas corticales, edema axonal, eosinofilia ⁴⁴, la apoptosis se detecta de forma más temprana 24 horas posteriores a evento de hemorragia⁴⁵.

Las arterias cerebrales son extremadamente sensibles a cambios en el ambiente circundante. Difieren de las arterias sistémicas en poseer una túnica adventicia delgada, ausencia de lámina elástica externa o vasa vasorum, reciben nutrición de sangre y LCR a medida que este se filtra a través de los poros de la adventicia. Consecuentemente las arterias cerebrales responden a trauma mecánico, estimulación eléctrica⁴⁶, cambios en la tensión de oxígeno⁴⁷, aplicación tópica de sustancias químicas como monoaminas⁴⁸, prostaglandinas⁴⁹, endotelinas⁵⁰, donadores de oxido nítrico⁵¹, ataque por radicales libres⁵² o contacto con sangre⁵³. El trauma mecánico ha sido propuesto como causa de la vasoconstricción después de hemorragia subaracnoidea⁴⁶, la vasoconstricción generada por exposición a la sangre es más prolongada⁵⁴, los aneurismas sangran por

aproximadamente 1-3 minutos después de su ruptura inicial⁵⁵, la sangre liberada forma coágulos de manera inmediata y desaparece en 2 a 3 días⁵⁶, probablemente vía reabsorción por vellosidades subaracnoideas⁵⁷ y lisis de coágulos⁵⁸. El índice de lisis del coágulo en el espacio subaracnoideo depende del volumen de sangre liberado (LCR normalmente no es un fluido fibrinolíticamente activo)⁵⁹, la actividad fibrinolítica detectada en espacio subaracnoideo posterior a hemorragia subaracnoidea se corrobora con la presencia de oxihemoglobina y xantocromía del propio LCR⁵⁶.

Asimismo, el volumen de sangre liberado durante la hemorragia subaracnoidea correlaciona con los déficits neurológicos y el resultado clínico pobre⁶⁰. Durante los años 70's y 80's se realizaron investigaciones para determinar que fracción de la sangre era responsable de la vasoconstricción después de hemorragia subaracnoidea; se encontró respuesta de vasoconstricción ante exposición a componente sérico y plasma rico en plaquetas^{61 62}, sin embargo esta reacción de vasoconstricción disminuía con el tiempo de exposición, al contrario de la vasoconstricción mediada por exposición a eritrocitos, la cual incrementaba con el tiempo de exposición, consecuentemente se concluye que la exposición a eritrocitos influye en el desarrollo de isquemia cerebral tardía⁶¹.

No es necesaria la lisis de eritrocitos para generar este efecto vasoconstrictor, pues la hemoglobina rapta óxido nítrico, hacia el interior del eritrocito, creando con esto una deficiencia de óxido nítrico⁶³; además, el ambiente hipóxico cerebral promueve la autoxidación de la hemoglobina lo que lleva a la generación de especies activas de oxígeno, lo cual produce daño directo o genera otras especies oxidativas a través de la reacción de Feber-Weiss como el peroxinitrito⁶⁴.

Por otro lado el óxido nítrico apoya primariamente el flujo sanguíneo cerebral basal, siendo sintetizado a demanda por la óxido nítrico sintasa⁶⁵, a través de sus 3 isoenzimas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS)⁶⁶. Los niveles de óxido nítrico se elevan

profundamente debido a la sobre regulación aguda (en 1 hora) de isoformas e y n en microvasos y parénquima (ratas)⁶⁷, y 6 a 12 horas después debido a la expresión de la forma inducible, en astrocitos reactivos y neutrófilos (ratas)⁶⁸. Las isoenzimas neuronal e inducible participan en neurotoxicidad, ya que su producción en grandes cantidades involucra daño en DNA y activación de poli ADP sintasa, con depleción subsecuente de NAD⁺ y ATP por daño mitocondrial⁶⁹ lo cual conduce a necrosis y apoptosis. En presencia de hemorragia subaracnoidea el efecto relajante endotelial está alterado, mientras que la capacidad de síntesis de este se encuentra intacta⁵¹. En presencia de hemorragia subaracnoidea está documentado la disminución de la concentración de óxido nítrico 10 minutos posteriores a su inicio⁷⁰, esto conlleva a su vez incremento de la demanda, por lo cual la elevación de la isoenzima inducible se detecta 96 horas posteriores a hemorragia subaracnoidea. Se ha hipotetizado una respuesta trifásica en los niveles cerebrales de óxido nítrico. Estas fases son decremento agudo (fase I) que ocurre en la primera hora del evento de hemorragia subaracnoidea, recuperación transitoria (fase II) la cual ocurre entre 1 a 6 horas del inicio del evento y la fase de incremento sostenido (Fase III), la cual ocurre desde las 6 horas hasta los 7 días posteriores al inicio del evento de hemorragia subaracnoidea³⁴.

La agregación intraluminal de plaquetas es una respuesta fisiológica a muchos tipos de lesiones cerebrovasculares⁷¹, observándose 5 minutos posterior a inicio de hemorragia subaracnoidea (gatos)⁷², además de la obstrucción mecánica del lumen vascular, los agregados plaquetarios liberan varios agentes vasoconstrictores como serotonina, ADP y factor de crecimiento derivado de plaquetas (que se detecta 24 horas posteriores al inicio de la hemorragia subaracnoidea)⁷³; también liberan enzimas como las metaloproteinasas de matriz 1,-2 y-9; lo cuales son capaces de degradar la lámina basal de colágeno tipo IV (horas posteriores a HSA)(ratas)⁷⁴. El óxido nítrico inhibe la agregación plaquetaria por vía

de evitar el reclutamiento de plaquetas en un trombo creciente a través de un mecanismo mediado por Guanosina cíclica 3',5'-monofosfato (cGMP)⁷⁵. Una vía constitutivamente activa L-arginina/ON se encuentra en las plaquetas para causar retroalimentación negativa en la agregación de estas⁷⁶. La pérdida de este punto de control debida a la síntesis alterada de óxido nítrico plaquetario puede contribuir a la patogénesis de enfermedades vasculares. Por ejemplo, el secuestro de óxido nítrico por la hemoglobina liberada en un evento de hemorragia subaracnoidea lleva a incremento de agregación plaquetaria³⁴.

El daño oxidativo presente durante condiciones de isquemia cerebral se ha ligado principalmente a especies de oxígeno reactivas como el anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito³⁴. Generan daño a través de disrupción de la barrera hematoencefálica y daño a ligandos fosfolípidos de membrana vascular, produciendo 2 mensajeros como inositol 3 fosfato y diacilglicerol, los cuales ocasionan vasoconstricción³⁴; las fuentes de radicales libres durante la hemorragia subaracnoidea comprenden la lisis de eritrocitos y los picos de síntesis de óxido nítrico⁷⁷. Compuestos espasmógenos como los leucotrienos C4, Prostaglandinas D2, se detectan de forma temprana ante hemorragia subaracnoidea (1-6 horas)⁷⁸ y prevalecen hasta 3 días posteriores. La mayor defensa sistémica ante el peróxido de hidrógeno la Glutation peroxidasa se depleta 48 horas posteriores al evento de hemorragia subaracnoidea³⁷. En líquido cefalorraquídeo, la expresión de hidroperóxido de fosfatidilcolina y colesterol ester de hidroperóxido se incrementan después de 48 horas del inicio de la hemorragia y pueden predecir vasoespasmo⁷⁹. Las vitaminas E y A antioxidantes se encuentran significativamente disminuidas en plasma después de 12 horas del evento de hemorragia subaracnoidea⁸⁰.

IV. DIAGNOSTICO:

El estudio diagnóstico de elección para hemorragia subaracnoidea es la tomografía de cráneo sin medio de contraste, mantiene su sensibilidad elevada los 5 primeros días; posteriormente decrece, tiene un nivel de evidencia 2, con grado de recomendación B.

Asimismo, el estudio de elección para determinar la fuente de sangrado es la resonancia magnética; y la angiografía si se sospecha un aneurisma. La angio-resonancia magnética y la angio-tomografía de cráneo, son muy sensibles para aneurismas de los vasos del polígono de Willis mayores de 5 mm, con el mismo nivel de evidencia y grado de recomendación que el anteriormente mencionado⁸¹.

V. TRATAMIENTO:

La estancia hospitalaria varia de 2 a 98 días, se realizó tratamiento invasivo en 69% de estos pacientes; siendo el neuroquirúrgico abierto realizado en 81% de estas intervenciones invasivas y endovascular en 18%. 54% de dichos pacientes falleció debido a una causa neurológica la cual no está diferenciada entre complicaciones debidas al vasoespasmo cerebral y otras. Sin embargo, si se recabaron datos de la prevalencia del vasoespasmo, pero solo en una fracción de los casos totales, la cual fue de 198; en esta fracción, la prevalencia de vasoespasmo cerebral fue de 44%.

El resultado funcional de esta cohorte fue de 11% con dependencia para realizar actividades de vida diaria (discapacidad severa), 14% con dependencia parcial e incapacidad para la marcha autónoma, 19% capaz de deambular sin asistencia, 13% con discapacidad leve y 13% con alteraciones mínimas¹⁰.

Como bien se detalla en este subestudio, existe ausencia de datos en cuanto a los resultados terapéuticos del tratamiento de la enfermedad aneurismática intracraneal en el país.

VI. ESTUDIOS REALIZADOS PREVIAMENTE:

Las variables deseables de un biomarcador de lesión cerebral son la alta sensibilidad-especificidad, valor predictivo positivo, razón de verosimilitud (likelihood ratio) positiva elevada, área debajo de la curva, bajo valor predictivo negativo y razón de verosimilitud negativa baja. Además de costo efectividad adecuada.⁸²

Existe evidencia creciente que señala que las metaloproteinasas de matriz tienen un papel clave en el desarrollo de isquemia cerebral tardía.⁸³

La metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) una endopeptidasa de cinc, es producida por leucocitos y células gliales y tiene actividad colagenasa⁸⁴, experimentos en modelos animales han ligado a esta enzima a la fisiopatogenia de la isquemia cerebral tardía⁸⁵. Esta enzima mantiene una regulación a la alza posterior a hemorragia subaracnoidea en ratas, degradando la matriz de colágeno tipo IV que representa un componente mayor estructural de la lámina basal²⁴. También se hipotetiza su participación en daño cerebral temprano a través de la reducción de las propiedades antiinflamatorias de gelsolina⁸⁶ y a través de la conversión de la gran endotelina-1 en moléculas pequeñas altamente vasoactivas⁸⁷. De hecho en los ratones modificados con knockout de MMP-9 se observa menos edema cerebral y mejoría del resultado neurológico final comparativamente con animales no modificados genéticamente⁸⁸.

La vía inflamatoria que implica estos compuestos con el desarrollo de isquemia cerebral tardía se activa de forma tan temprana como 2 horas posterior al evento de hemorragia subaracnoidea, a través de la liberación neuronal de proteínas de la caja de grupo de alta movilidad 1, cuya actividad extracelular regula al alza a la MMP-9⁸⁹.

En modelos de rata las concentraciones de MMP-9 se incrementan de forma tan temprana como 3 horas después de la hemorragia subaracnoidea, alcanzando un pico al día 3 de la misma⁹⁰. Un estudio posmortem en humanos después de hemorragia intracraneal encontró que la expresión de MMP-9 estaba regulada al alza desde el día 2 posterior a la hemorragia

subaracnoidea⁹¹, el hecho de que la MMP-9 se incrementa rápidamente después de un evento de hemorragia subaracnoidea, indica que puede ser un potencial biomarcador de predicción temprana de isquemia cerebral tardía⁹².

La lesión temprana cerebral después de hemorragia subaracnoidea se ha relacionado con incremento de parámetros inflamatorios a nivel sérico y de LCR, sin embargo, los resultados son ambiguos. Existen variaciones importantes interindividuos, así como diferentes compartimentos para toma de la muestra analizada (Sangre, LCR o fluido extracelular adquirido por microdiálisis).

En un análisis de 109 pacientes por un período de tiempo de 21 meses con toma de muestras séricas y de LCR entre 5 y 6 am, en los días 1,4,7,10 y 14 posteriores a hemorragia subaracnoidea se determinó lo siguiente:

El pico de nivel sérico de Interleucina 6 se obtuvo el día 1 después de la hemorragia subaracnoidea, mientras que el pico en LCR fue el día 4. Los niveles en LCR fueron 10 veces más elevados que los séricos (2000 pg/ml vs 25 pg/ml como puntos de corte). La interleucina 6 se asoció además con valores mayores ante una escala de WFNS mayor de 3, invirtiéndose esta relación al día 14 (en donde la concentración fue mayor en una escala de WFNS menor de 3).

Metalopeptidasa 9 de matriz tiene pico de concentración en LCR al día 4 y sérico al día 7, las concentraciones séricas fueron más elevadas que las de LCR (1200 ng/ml vs 20 ng/ml como punto de corte).

En un estudio llevado a cabo en Marsella se midieron concentraciones de MMP-9 en LCR, con el fin de determinar su utilidad para predicción de isquemia cerebral tardía en 30 pacientes, encontrando que solo la concentración (antígeno) en LCR a las 24 horas era estadísticamente significativa para predicción de isquemia cerebral tardía. No ocurriendo así para la medición de la actividad de MMP-9 (Zimografía en gel) en LCR⁹².

Molécula de adhesión intercelular 1 no se logró la detección mínima posible en LCR (6.3ng/ml) en 45.8% de las muestras, con concentración pico en el resto de las muestras el día 4, sin embargo, la variabilidad de los resultados fue muy alta.

Factor inhibidor de leucemia mostró una gran variabilidad al comparar las muestras séricas y las de LCR; en LCR se objetivo un pico (>200 pg/ml) muy temprano seguido por una rápida caída, los niveles séricos fueron 10 veces menores (20 vs 200pg/ml respectivamente).

La proteína C Reactiva en su nivel sérico tuvo su nadir en el día 4, al igual que la cuenta leucocitaria. Se ha asociado el pico leucocitario a la presencia de isquemia cerebral tardía, se presentan concentraciones séricas más elevadas de proteína C reactiva a mayor escala de WFNS en los días 1 a 4.⁹³

Uno de los factores clave que contribuyen a la disrupción de la barrera hematoencefálica y edema cerebral, puede ser la muerte celular apoptótica que ocurre en las neuronas y células endoteliales cerebrales^{94,95}. La integridad de la barrera hematoencefálica puede ser afectada por alteraciones en las uniones estrechas entre células endoteliales adyacentes microvasculares⁹⁶. Las uniones estrechas se componen de moléculas transmembrana (claudina, ocludina y moléculas adhesivas de unión estrecha) ligadas a la actina del citoesqueleto a través de proteínas citoplasmáticas accesorias, incluyéndose zónula occludens ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Claudinas son las principales proteínas formadoras de barrera que pertenecen a la familia de proteínas PMP22/EMP/MP20/Claudina. La claudina 5 es una molécula de adhesión celular mayor en las uniones estrechas de las células endoteliales cerebrales. La depleción de claudina 5 resulta en incremento de la permeabilidad selectiva de tamaño de la barrera hematoencefálica. ZO-1 pertenece a una familia de homólogos asociados a membrana similares a guanilato cinasa. ZO-1 transporta

múltiples sitios de unión para ocludina, claudina, ZO-2, ZO-3, cingulina y actina, lo que le permite mantener y regular las uniones estrechas.

Muchas vías de señal han sido sugeridas para mediar lesiones cerebrales tempranas después de hemorragia subaracnoidea. Las c-Jun N-cinasa terminal (JNK) es un miembro de la familia de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK), la cual se expresa inducida por isquemia cerebral y componentes lesivos de la sangre inmediatamente posterior a la hemorragia subaracnoidea. Las proteínas JNK son codificadas por 3 genes: JNK1, JNK2 y JNK3, cada uno de los cuales experimenta empalmes alternos para expresar varias isoformas. Tanto la JNK1 como la JNK2 se expresan en todos los tejidos; mientras JNK3 se expresa en tejido neural y cardíaco.

En un estudio realizado en un modelo animal de rata, se demuestra que la hemorragia subaracnoidea resulta en ruptura de la barrera hematoencefálica y edema cerebral, con incremento concomitante en muerte celular apoptótica en la corteza cerebral y reducción en los niveles de claudina-5 y zónula occludens-1 el pretratamiento con SP600125 (un inhibidor químico de las proteínas JNK), el cual atenúa las lesiones relacionadas con la hemorragia subaracnoidea y restaura la expresión de claudina 5 y ZO-1.⁹⁷

No existe al momento actual un modelo de comportamiento registrado que relacione el cambio en la expresión de las proteínas de unión de la barrera hematoencefálica en presencia de hemorragia subaracnoidea y de su relación con el vasoespasmo, por lo tanto, podemos considerar que este vacío en el conocimiento de la fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea aún resta por ser llenado.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Dependiendo de la población y el diseño del estudio a nivel mundial, se calcula que la hemorragia subaracnoidea comprende menos del 10% de las formas clínicas de enfermedad cerebrovascular aguda, visto desde otro ángulo, la hemorragia subaracnoidea como resultado de la ruptura de aneurismas intracraneales corresponde al 85% de todos los casos de hemorragia subaracnoidea; con mayor prevalencia en unidades de referencia nacional¹⁰.

En nuestro país, la principal causa de hemorragia subaracnoidea espontánea (no traumática) fue la rotura de un aneurisma cerebral (85.5%); en 15% restante, la angiografía cerebral, que constituye el estándar de oro actual para el diagnóstico de enfermedad aneurismática intracraneal⁸¹, fue negativa para aneurisma (RENAMEVASC 2011)⁹.

En Estados Unidos se ha observado mayor incidencia de HSA en hispanos. El proyecto BASIC ("Brain Attack Surveillance In Corpus Christi") encontró que la HSA es 1.6 veces más frecuente en Mexicano-Americanos (14.1 casos por cada 10,000 habitantes) que en raza blanca (8.7 por 10,000)⁹⁸.

En un subestudio del registro RENAMEVASC, Ruíz Sandoval et al, analizaron 231 casos de hemorragia intracraneal asociada a rotura de aneurismas cerebrales, los cuales fueron registrados en un período de 2 años en 25 centros de referencia de tercer nivel de 14 estados del país (todos realizados en centros urbanos). 66% de estos fue del sexo femenino y 44% del sexo masculino, con predominio de edad mayor de 50 años (60%) con rango desde 16 hasta 90 años.

La estancia hospitalaria varió de 2 a 98 días, se realizó tratamiento invasivo en 69% de estos pacientes; Se recabaron datos de la prevalencia del vasoespasma, pero solo en una fracción de los casos totales, la cual fue de 198; en esta fracción, dicha prevalencia de fue de 44%.

El resultado funcional de esta cohorte fue de 25% de pacientes con dependencia para realizar actividades de vida diaria (Discapacidad severa/moderada), lo cual deja en claro la importancia de las secuelas de la hemorragia subaracnoidea en este grupo de casos con enfermedad aneurismática intracraneal.

Como bien se ha detallado, hasta el momento la fisiopatología que permita la comprensión de los fenómenos que suceden después de la aparición de hemorragia en el espacio subaracnoideo no es del todo conocida, existe ausencia de conocimiento de comportamiento de biomarcadores de disrupción de barrera hematoencefálica en LCR en una cohorte de casos y controles de pacientes con enfermedad aneurismática en México, los cuales desembocarán al final en dos comportamientos básicos: presencia de vasoespasma cerebral y/o ausencia del mismo; con las subsecuentes secuelas ya mencionadas.

4.- JUSTIFICACIÓN:

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es la tercera causa de muerte en países del primer mundo. De todos los tipos de EVC, la hemorragia subaracnoidea (HSA) es responsable de 22% a 29% de la mortalidad. Ya se ha mencionado que de la hemorragia subaracnoidea que es enviada a centros de referencia nacionales, el 85.5% de está, es de etiología aneurismática; esto destaca la relevancia de dicha etiología en unidades de tercer nivel de atención (RENEMEASC 2011).

Alrededor de 30% de los pacientes con hemorragia subaracnoidea (HSA) secundaria a ruptura de aneurisma cerebral, desarrollan vasoespasmos arteriales y con ello el déficit neurológico asociado aumenta. Esta complicación empeora el pronóstico de los pacientes, puesto que un 25% de ellos mueren y otro 30% a 35% sufren de déficit neurológico permanente.

La ausencia de entendimiento cabal de la fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea ha creado vacíos que es preciso llenar, si se quiere aspirar a una terapéutica final e integral de la hemorragia subaracnoidea.

En ese entendimiento, y la ausencia casi total de estudios realizados en población mexicana y específicamente en el hospital de Especialidades UMAE CMN SXXI, este estudio busca llenar ese vacío documental del comportamiento (expresión) de las proteínas que funcionan como biomarcador de disrupción de la barrera hematoencefálica en líquido cefalorraquídeo que existe en la población que sufre las devastadoras consecuencias de la enfermedad aneurismática intracraneal, para la cual se busca brindar atención de calidad multidisciplinaria, reduciendo con esto las secuelas que ocasionen discapacidad en dichos pacientes y que forman parte de las muchas secuelas de esta compleja enfermedad.

El conocimiento obtenido servirá para enriquecer la comprensión de la fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea aneurismática del sistema nervioso central, como ya se ha observado en la literatura previa, el ingreso de sangre al espacio subaracnoideo en el contexto de enfermedad aneurismática es un evento catastrófico que desata una cascada de eventos que finalizarán en el desarrollo de vasoespasmos e isquemia cerebral diferida. En este contexto conocer el comportamiento y la expresión de estos biomarcadores de daño a la membrana hematoencefálica capitaliza la idea de su preponderancia en la génesis de dichas complicaciones. Se escogió como nicho de medición el líquido cefalorraquídeo, pues ya se ha mencionado que el valor de biomarcadores es de mayor cuantía en forma local que en su medición sérica (Triglia et al 2016); aunque las variaciones individuales y respecto a etiología exclusivamente en patología aneurismática, no se tienen registradas.

Este estudio se sumaría a los estudios que buscan aclarar el papel de los biomarcadores en la predicción y, en un futuro, tratamiento del vasoespasmos cerebral.

En el futuro, al realizarse más estudios de este tipo se busca homogeneizar una estrategia de detección y prevención de las complicaciones antes mencionadas que será de utilidad para los pacientes que reciben atención en el servicio de Neurocirugía del Hospital de Especialidades CMN SXXI.

5.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es la expresión en líquido cefalorraquídeo de biomarcadores de disrupción de barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea de origen aneurismático?

6.- HIPOTESIS

Existe disminución de la concentración de marcadores de disrupción de la membrana hematoencefálica (Ocludina y claudina 5) e incremento de la concentración del marcador de disrupción de membrana basal (MMP9) en pacientes con hemorragia subaracnoidea en comparación contra controles de pacientes con aneurismas no rotos.

7.- OBJETIVO:

OBJETIVO GENERAL:

Identificar y analizar el comportamiento de marcadores biológicos (occludina, claudina 5 y MMP9) implicados en la disrupción de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática.

Identificar y analizar el comportamiento de marcadores biológicos (occludina, claudina 5 y MMP9) implicados en la disrupción de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica en pacientes sin hemorragia subaracnoidea aneurismática.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

Crear una base de datos de enfermedad aneurismática en población que se atiende en el servicio de Neurocirugía del Hospital de Especialidades UMAE 611 CMN SXXI.

Recopilar datos acerca de valores en pacientes control (aneurismas no rotos) de occludina, Claudina 5 y Metaloproteinasa 9 en población atendida en dicho hospital.

Modelo de comportamiento de biomarcadores de disrupción de barrera hematoencefálica (occludina, Claudina 5 y MMP9) en pacientes con hemorragia subaracnoidea y controles con enfermedad aneurismática no complicada que sirva para futuras investigaciones.

8.- MATERIAL Y MÉTODOS:

1) DISEÑO:

Estudio *observacional, descriptivo, comparativo, longitudinal prospectivo en una cohorte de pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática.*

1. **Características del lugar en donde se llevará a cabo el estudio:**
2. **El estudio se realizará en Hospital de Especialidades UMAE 611, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México. En un período comprendido entre septiembre 2019 a julio 2020, período durante el cual se obtendrán muestras de LCR cisternal de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión a medida que ingresen para tratamiento quirúrgico de enfermedad aneurismática intracraneal ya sea urgente o programado.**
3. **Diseño de estudio:** Analítico: Casos y controles.
4. **Tipo de estudio:** No experimental
De acuerdo con el control que el investigador tendrá sobre las variables:
Observacional
Por la finalidad del estudio: Descriptivo.
Por el tiempo de captación de la información: Prospectivo.
Por la medición del fenómeno en el tiempo: Longitudinal.

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO (EJES DE LA INVESTIGACION)	
Por el control de la maniobra por el investigador	Observacional
Por la medición en el tiempo	Longitudinal
Por la dirección de la investigación	Prospectivo
Por el tipo de muestreo	No aleatorio
Por la recolección de la información	Prolectivo
Por la asignación de la maniobra	No aleatorizado
Por el número de grupos	Comparativo
Por el tipo de comparación	Concurrente
Por el tipo de población	Homodémico
Por el cegamiento en la evaluación	Abierto

9.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

Universo de trabajo

- a. Pacientes con diagnóstico de enfermedad aneurismática intracraneana con o sin hemorragia subaracnoidea del Hospital de Especialidades de CMNSXXI que acuden a tratamiento quirúrgico resolutivo.
- b. Periodo de realización del estudio: Se obtuvieron datos del estudio por casos consecutivos registrados en el período 01 de septiembre 2019 a 30 de julio 2020.

Criterios de Selección:

a. Criterios de Inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de enfermedad aneurismática intracraneal.
2. Pacientes con tratamiento quirúrgico de la enfermedad aneurismática llevado a cabo en este hospital.
3. Pacientes mayores de 18 años.

b. Criterios de No Inclusión:

1. Pacientes con enfermedad aneurismática sin tratamiento quirúrgico de la enfermedad aneurismática.

c. Criterios de Exclusión o de eliminación:

1. Pacientes sin toma de muestra de LCR durante tratamiento quirúrgico de la enfermedad aneurismática.

10.- Selección de la muestra:

- a) **Tipo de muestreo:** no probabilístico.
- b) **Tamaño de la muestra:** Se trata de un muestreo por conveniencia, es decir, no probabilístico por lo que no se realiza tamaño de la muestra, casos consecutivos.

Descripción de las variables:

Variable independiente: Valor de expresión de ocludina, Claudina 5 y metaloproteasa 9 de matriz.

5. Definición y Operacionalización de variables:

Variables:

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala de medición	Unidades de medición o categorías
Valor numérico de ocludina, Claudina 5 y Metaloproteasa 9 de matriz	Valor de densidad integrado	Niveles de expresión	Cuantitativa	Niveles a la baja o alta en base a una proteína constitutiva
Fecha de toma de muestra	Día en que se tomó la muestra de LCR	Día en que se tomó la muestra de LCR	Cuantitativa	Registro en libreta de recabado de datos de pacientes.
Presencia de signos clínicos de Vasoespasmo	Presencia de signos clínicos sugestivos de vasoespasmo cerebral	Deterioro de las condiciones neurológicas previas del paciente en estudio	Cualitativa	Escala de coma de Glasgow Afasia Déficit motor focal
Presencia de signos radiológicos de vasoespasmo	Reducción del calibre de la luz de una arteria en el espacio subaracnoideo en estudio de gabinete o presencia de área isquémica nueva en estudio progresivo en tiempo de hospitalización de gabinete.	Reducción del calibre de la luz de una arteria en el espacio subaracnoideo en estudio de gabinete o presencia de área isquémica nueva en estudio progresivo en tiempo de hospitalización de gabinete.	Cualitativa	Nueva área de isquemia focal no relacionada con abordaje quirúrgico. Disminución de calibre arterial en estudios contrastados de encéfalo.
Clasificación de Fisher	Escala utilizada para clasificar la severidad de una hemorragia subaracnoidea aneurismática por tomografía simple de encéfalo.	Evaluación mediante la realización de una tomografía simple de encéfalo.	Cualitativa ordinal	Presencia de sangre en espacio subaracnoideo. Grados del 1 al 4.
Clasificación de WFNS	Escala utilizada para clasificar la severidad de una hemorragia subaracnoidea aneurismática.	Evaluación de la condición clínica del paciente basado en la escala de coma de Glasgow y déficit motor focal.	Cualitativa ordinal	Calificación de escala de Coma de Glasgow y presencia o ausencia de déficit motor focal. Grados del I al V.

Clasificación de Hunt&Hess	de	Escala utilizada para clasificar la severidad de una hemorragia subaracnoidea aneurismática.	Evaluación de la condición clínica del paciente basado en la sintomatología, déficit neurológico focal y estado de alerta.	Cualitativa ordinal	Estado de alerta y presencia o ausencia de déficit neurológico focal. Grados del 0 al V.
Presencia de hemorragia parenquimatosa	de	Presencia de sangre en el parénquima encefálico.	Presencia de imagen en tomografía simple de cráneo con unidades Hounsfield de densidad compatible con sangre en parénquima encefálico.	Cualitativa	Presencia o ausencia.
Presencia de Hidrocefalia	de	Datos clínicos y por imagen compatibles con el diagnóstico de hidrocefalia secundaria a la presencia de hemorragia subaracnoidea intracraneal.	Datos clínicos y por imagen de ventriculomegalia, edema transependimario o índices de medición que sean compatibles con hidrocefalia en algún momento de la hospitalización que no exceda las 3 semanas.	Cualitativa	Presencia o ausencia.
Hidrocefalia como complicación tardía	de	Datos clínicos y por imagen compatibles con el diagnóstico de hidrocefalia secundaria a la presencia de hemorragia subaracnoidea intracraneal.	Datos clínicos y por imagen de ventriculomegalia, edema transependimario o índices de medición que sean compatibles con hidrocefalia en algún momento de la hospitalización posterior a las 3 semanas.	Cualitativa	Presencia o ausencia.
Día de presentación de vasoespasmó	de	Día en que ocurre diagnóstico clínico o por imagen de vasoespasmó.	Día de la hospitalización en el que se presentan datos en estudio de imagen compatibles con vasoespasmó.	Cuantitativa	Presencia o ausencia.
Localización de aneurisma	de	Topografía en relación con vaso sanguíneo intracraneal afectado por la	Topografía en relación con vaso sanguíneo intracraneal afectado por la enfermedad aneurismática.	Cualitativa	Segmento afectado.

	enfermedad aneurismática.			
Cantidad de aneurismas	Cantidad de lesiones aneurismáticas en el mismo paciente.	Cantidad de lesiones aneurismáticas en estudio de angiogramografía o angiografía.	Cuantitativa	Presencia o ausencia.

1) Procedimientos:

- a) **Captación de pacientes:** en Hospital de Especialidades UMAE 611, entre septiembre 2018 a octubre 2019. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México.
- b) **Obtención de la información:** se realizará toma de muestra de LCR mediante aspiración cisternal (cisterna basal interhemisférica) que es el primer paso de la fase intradural de la cirugía resolutive, durante la exposición del vaso afectado por la enfermedad aneurismática en el período de internamiento de los pacientes analizados. Se realizará revisión del expediente clínico, estudios de laboratorio y gabinete de los pacientes para obtención de los datos de variables con relación a hemorragia subaracnoidea para los casos y sin hemorragia subaracnoidea para los controles, dicha revisión se llevó a cabo por al menos 2 personas de forma conjunta como medida de control de calidad interobservador.
- c) **Medición de pruebas bioquímicas:** Técnica de Western Blot para identificación de las proteínas de unión
- d) **Procesamiento de las muestras:** La muestra de LCR se centrifugará a 18,000g X 15 minutos. La pastilla se solubilizará por sonicación en tritón X-100 al 2%, amortiguador trisbarbital 70 mM, pH 8.6, NaN3 15 mM, floruro de fenil-metil-sulfonil 0.1 mM (PMSF) y 100 U/ml de aprotinina, enseguida se centrifugará por 15 minutos a 18,000 g/15 min. El sobrenadante se colocará en dodecil-sulfato de sodio (SDS) (amortiguador Tris/HCl, pH 7.2, 2.3% w/v SDS, 3% v/v glicerol) el cual deberá contener 5% β -mercaptanol y se correrá en un gel de poliacrilamida a una concentración de 10%. Las proteínas se cargarán a una concentración de 70 μ l de muestra de proteínas en 50 μ l de H₂O destilada y 30 μ l de LB, obteniendo una concentración final de 150 μ l por alícuota, de la cual se tomará únicamente 30 μ l de muestra por carga, realizando la electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, 12% y 6% para las diferentes proteínas de acorde con su peso molecular, se corrieron a 85 volt por 2.5 hrs en cámara húmeda. Se transferirán a una membrana de nitrocelulosa por medio de una cámara de transferencia semi-húmeda, empleando 20volts por 1hrs. Las uniones no específicas se bloquearán incubando con leche svelty al 0.5% diluida en amortiguador PBS-Twen (Tris 50 mM, pH 10.2, NaCl 350 mM, PSMF 0.2mM) durante 1hrs. Se incubará por 24hrs con el anticuerpo primario; S-100B, Ocludina, Claudina 5 (Santa Cruz Biotechnology, Thermo). Se realizarán tres lavados con PBS-Twen cada uno por 5min y se aplicará el anticuerpo secundario IgG anti mouse marcado con peroxidasa y se revelara con reactivo quimioluminiscencia (Luminata Crescendo Western HRP, Millipore) por medio del equipo foto documentador Fusion FX Vilber Lourmat. Se tomarán las imágenes para ser analizadas. Se realizará un análisis de densidad de volumen por medio del programa software Quantity One de Bio-Rad.
- e) **Control de calidad:** Los datos obtenidos del análisis de densidad de cada proteína problema (IDV) serán normalizados con los datos de su correspondiente proteína control (V, albumina humana) y se reportan en valores de densidad integrado (IDV/V).

1. ANALISIS ESTADISTICO

Se harán tablas de datos de los diferentes protocolos con estadística descriptiva, para datos con una distribución paramétrica. Para los datos con distribución no paramétrica se efectuará la prueba Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de U de Mann-Whitney, pruebas de correlación de Pearson entre las diferentes variables clínicas y los metabolitos estudiados.

Los datos serán analizados con el paquete estadístico STATA versión 14-0.

Análisis estadístico será: descriptivo, comparativo.

Análisis de variables numéricas y categóricas: test de regresión lineal.

Comparación con literatura existente.

2. IMPLICACIONES ETICAS

Riesgo de la Investigación. Esta investigación se considera **categoría I (sin riesgo)** de acuerdo con la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la salud en seres humanos, título segundo, capítulo I, artículo 17, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1987.

Apego a normativas y tratados.

Apegado a los principios emanados de la 18ª asamblea médica de Helsinki, Finlandia, en 1964 y de las modificaciones hechas por la propia 29ª asamblea Médica mundial en Tokio. Japón en 1975, 35ª asamblea Mundial en Venecia, Italia en 1983, 41ª asamblea mundial en Hong Kong en 1989, 48ª Asamblea médica mundial en Somerset West, República de Sudáfrica en 1996 y por la 52ª Asamblea Médica mundial en Edimburgo, Escocia en 2000 y de acuerdo con la Ley General de Salud en México, el presente estudio no representa riesgo alguno y no requiere consentimiento informado.

Consentimiento informado: no requiere.

Potenciales beneficios: incremento del conocimiento de la fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea y vasoespasmos.

Potenciales riesgos: no existen ya que se trata del procedimiento rutinario realizado en la resolución quirúrgica habitual de estos casos.

Confidencialidad de la información. se garantizará la confidencialidad de la información.

Selección de los potenciales participantes: muestreo por casos consecutivos ya comentado.

3. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

Recursos Humanos:

3 RESIDENTES DE NEUROCIRUGIA EN FORMACION PARA RECABAR MUESTRA DE LCR EN QUIROFANO Y LLEVARLA A REFRIGERACION EN UNIDAD DE INVESTIGACION DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES UMAE 611 CMN SXXI.

PERSONAL DE UNIDAD DE INVESTIGACION DE ENFERMEDADES NEUROLOGICAS Y NEFROLOGICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES UMAE 611 CMN SXXI.

Recursos Materiales:

INFRAESTRUCTURA DEL SERVICIO DE NEUROCIRUGIA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SXXI Y DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION DEL MISMO HOSPITAL.

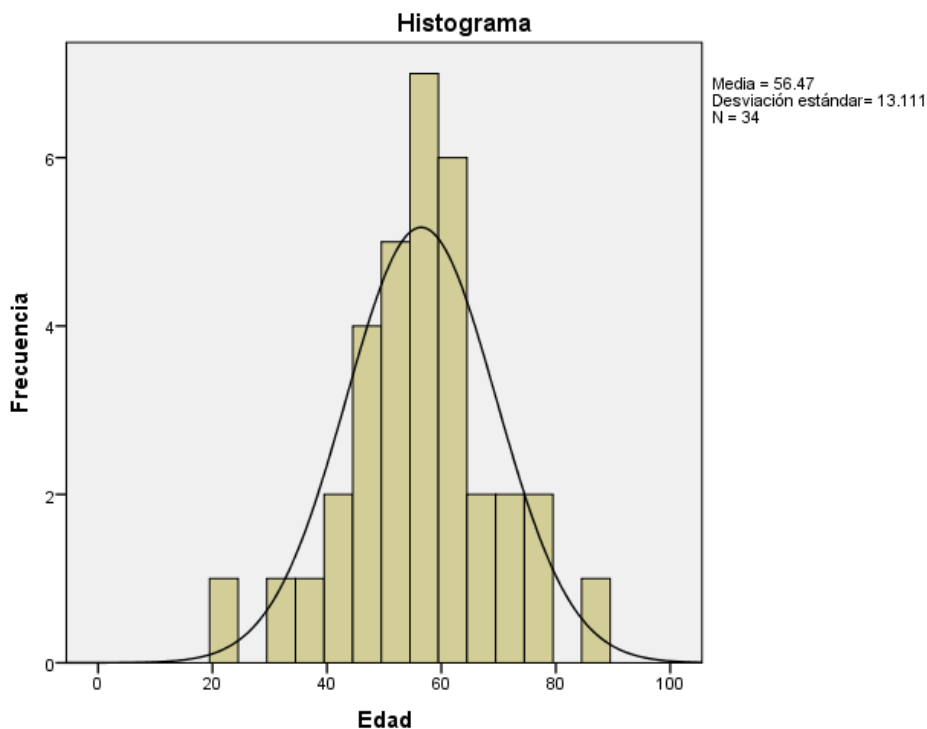
NO HAY FONDO MONETARIO.

8. RESULTADOS

Se tomaron muestras de LCR de la cisterna basal interhemisférica (durante el proceso quirúrgico resolutorio) de 36 pacientes hospitalizados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS; se excluyeron del análisis a 2 pacientes por la incapacidad de demostrarse lesión vascular. Finalmente se obtuvo una cohorte de 34 pacientes restantes, de los cuales, 21 (61.7%) fueron casos de hemorragia subaracnoidea por aneurismas intracraneales rotos y 13 (38.2%) correspondieron a controles con enfermedad aneurismática no rota que acudieron a procedimientos quirúrgicos programados. De estos, 27 (79.4%) pacientes fueron del sexo femenino y 7 (20.6%) del sexo masculino, detallado en la Tabla 1.

El rango de edad de los pacientes osciló entre los 22 y los 85 años, con una media de 56 años; dicha distribución por edad se detalla en la Figura 1.

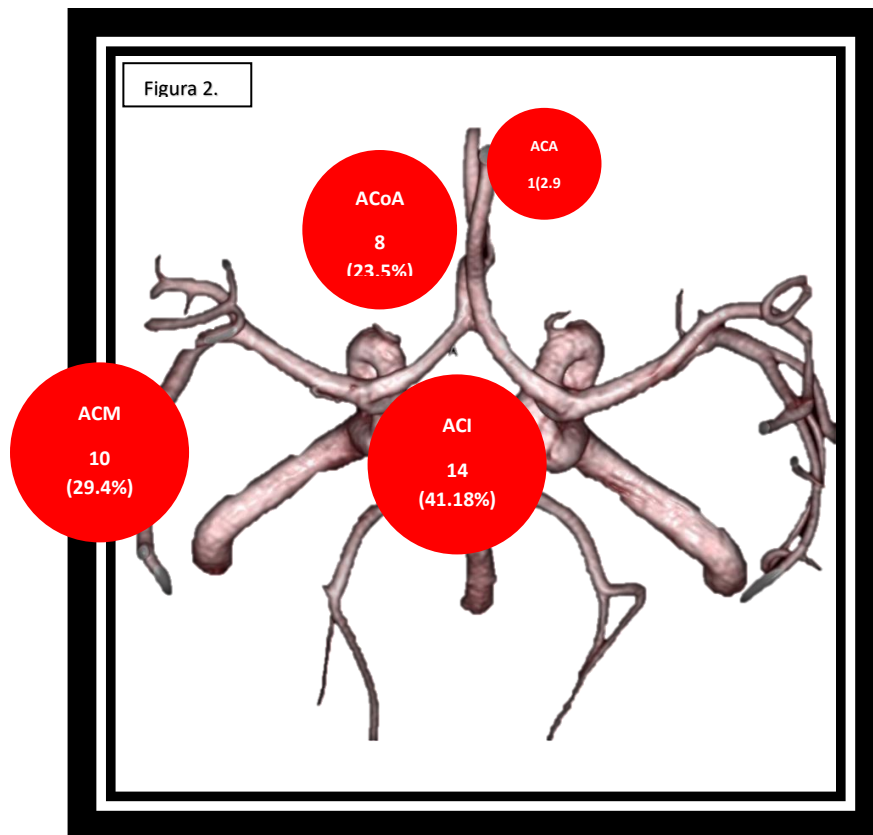
Figura 1. Distribución por edad.



Los factores de riesgo más relevantes encontrados, son: DM2 en 3 (8.8%) pacientes, tabaquismo en 12 (35.3 %) pacientes y la HAS en 19 pacientes (55.9 %), siendo está la comorbilidad más relevante en este estudio.

En cuanto a la distribución en la circulación intracraneal de los aneurismas cerebrales presentados; en total se contabilizaron 3% dependientes de circulación posterior y 97% dependientes de circulación anterior. En cuanto a lateralidad se encuentra predominio del lado derecho con 67.64%, mientras que el lado izquierdo se encuentra afectado en 32.36% de casos. En cuanto al vaso específico afectado, 10 (29.4%) casos corresponden a arteria cerebral media (8 derecha y 2 izquierda, 3 casos al segmento M1 y dos casos al segmento

M2), 1 caso a la arteria cerebral anterior segmento A2 (2.9%), 8 (23.5%) casos a la arteria comunicante anterior (predominio del lado derecho), 3 (8.8%) casos a la arteria comunicante posterior (predominio de lado derecho), 1 caso a la arteria coroidea anterior (2.9%) y 10 (29.4%) casos dependientes de arteria carótida interna (predominio derecho); de dicho total 5 (14.7%) de segmento paraclinoideo proximal, 4 (11.8%) de segmento comunicante y 1 de la bifurcación de este vaso (2.9%) y 1 caso (2.9%) dependiente de arteria vertebral, detallados estos hallazgos en la Figura 2.



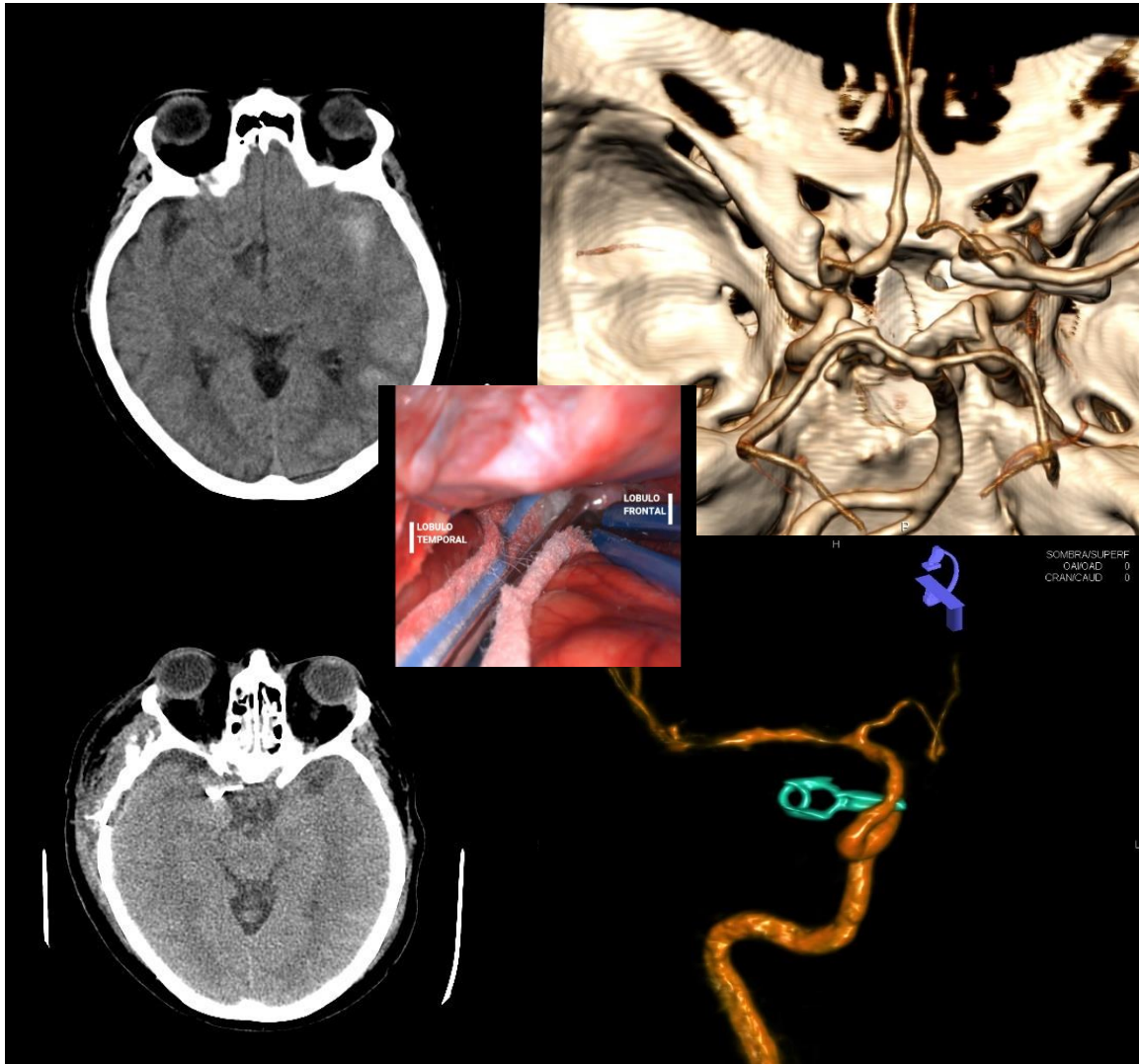
Se presentaron variantes anatómicas en 41.2% de los pacientes en ambos grupos. Es remarcable, que entre los pacientes del grupo control, la prevalencia de dichas variantes únicamente alcanzó el 23%, mientras que en el grupo de hemorragia subaracnoidea se presentaron en 81%.

En cuanto a la presentación clínica del grupo de pacientes con hemorragia subaracnoidea; se presentó cefalea en 57.1%, 14.3% con pérdida del estado de alerta, 23.8 % con crisis epilépticas, 4.8% con afasia. La cefalea centinela se presentó en 4.8% de los casos.

En el grupo de pacientes con hemorragia subaracnoidea la toma de muestra de LCR se realizó en promedio a los 7 días del sangrado inicial. En el grupo control se tomó al momento del procedimiento quirúrgico resolutivo como ya se comentó (Figura 3).

Tabla 1. Características basales de la población	
Total	n= 34
Edad (años) ^a	56.47 (13.1)
Sexo, n (%) ^b	
Mujer	27 (79.4)
Hombre	7 (20.6)
Tabaquismo, n (%) ^b	12 (35.3%)
Comorbilidad, n (%) ^b	
- Hipertensión arterial sistémica	19 (55.9%)
- Diabetes Mellitus 2	3 (8.8%)
Cefalea centinela, n (%) ^b	2 (5.9%)
Presentación clínica de los pacientes con hemorragia subaracnoidea, n (%) ^b	
-Cefalea	12 (35.3%)
-Crisis epilépticas	5 (14.3%)
-Pérdida del estado de alerta	3 (8.8%)
-Afasia	1 (2.9%)
Hunt & Hess al ingreso, n (%) ^b	
- 0	13 (38.2%)
- I-II	13 (38.2%)
- III-IV	8 (23.5%)
Circulación afectada, n (%) ^b	
- Anterior	33 (96.1%)
- Posterior	1 (2.9%)
Lado afectado, n (%) ^b	
- Derecho	23 (67.64%)
- Izquierdo	11 (32.36%)
Localización del aneurisma, n (%) ^b	
- Arteria cerebral media	10 (29.4%)
- Arteria carótida interna	10 (29.4%)
- Arteria comunicante anterior	8 (23.5%)
- Arteria comunicante posterior	3 (8.8%)
- Arteria cerebral anterior	1 (2.9%)
- Arteria coroidea anterior	1(2.9%)
Hemoglobina g/dL ^c	13.19 (12.5 – 14.2)
Hematocrito (%) ^a	40.38 (5.75)
Leucocitos 10³µL ^c	9.44 (5.99-11.11)
Plaquetas 10³µL ^a	253.3 (71.12)
Glucosa mg/dL ^c	109.5 (96-130.5)
Urea mg/dL ^a	26.68 (8.88)
Creatinina mg/dL ^c	0.65 (0.55-0.79)
Na⁺ mEq/L ^c	141 (137.7-143)
K⁺ mEq/L ^a	3.83 (0.5)
Cl⁻ mEq/L ^a	103.32 (5.45)
a: Los datos son presentados en media y DE. b: Los datos son presentados en frecuencias y porcentajes. c: Los datos son presentados en mediana y percentil 25 – 75	

Figura 3. Ejemplo de procedimiento quirúrgico resolutorio de la enfermedad aneurismática. Se toma la muestra cisternal de LCR y se coloca un clip vascular para reconstruir la bifurcación de la arteria carótida interna derecha. En la angiografía de control se demuestra la restitución de su morfología original.



Se dividió el total de pacientes en dos grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia de hemorragia subaracnoidea al momento del ingreso hospitalario (grupo de hemorragia subaracnoidea y grupo control).

El grupo que ingresó al hospital con hemorragia subaracnoidea tuvo la siguiente distribución en cuanto a la puntuación de las diferentes escalas clínicas y radiográficas:

Glasgow: 14 pacientes (66.7%) con 14-15 puntos, 3 pacientes (14.3%) con 9-13 puntos y 4 pacientes (19%) con 3-8 puntos.

Fisher modificado: 2 pacientes (9.5%) Grado 1-2 y 19 pacientes (90.5%) Grados 3-4.

WFNS: 8 pacientes (38.1%) Grado I, 7 pacientes (33.3%) Grados II-III y 6 pacientes (28.6%) Grados IV-V.

En cuanto a la escala de Hunt-Hess que contempla en su clasificación pacientes con aneurismas no rotos (Hunt & Hess 0), se tuvo la siguiente distribución:

Grado 0: 13 pacientes (38.2%), Grados I-II: 13 pacientes (38.2%), Grados III-IV: 8 pacientes (23.5%).

El resumen de estas categorías se observa en la Tabla 2:

Tabla 2. Características de la población con hemorragia subaracnoidea	
Categoría	Grupo de hemorragia subaracnoidea
Glasgow al ingreso ^a	n (%)
14-15	14 (66.7%)
9-13	3 (14.3%)
3-8	4 (19%)
Fisher al ingreso ^a	n (%)
1-2	2 (9.5%)
3-4	19 (90.5%)
WFNS al ingreso ^a	n (%)
Grado I	8 (38.1%)
Grados II-III	7 (33.3%)
Grados IV-V	6 (28.6%)
Hunt & Hess al ingreso ^a	n (%)
I-II	13 (38.2%)
III-IV	8 (23.5%)

a: Los datos se presentan en frecuencia y porcentaje

El lado más afectado fue el derecho con 50%, seguido de bilateralidad en 26.5% y el lado izquierdo 23.5%.

En cuanto a las complicaciones asociadas en el grupo de hemorragia subaracnoidea, no se presentaron complicaciones durante la hospitalización en 52.4%. El resto de las complicaciones médicas asociadas se distribuyó de la siguiente manera: neumonía asociada a cuidados de la salud en 9.5% de los pacientes, lesión renal aguda en 4.8% de los pacientes, desequilibrio hidroelectrolítico en 4.8% de los pacientes y alteraciones psiquiátricas en 14.4% de los pacientes.

En cuanto a las complicaciones asociadas de forma primaria con la hemorragia subaracnoidea la distribución es la siguiente: vasoespasmo en 52.4% de los pacientes, del cual 19% correspondió a vasoespasmo radiológico con infarto parenquimatoso asociado y 4.8% a vasoespasmo sintomático; hidrocefalia en 23.8% de los pacientes al ingreso, muerte durante la hospitalización en 19% de los pacientes.

No hubo complicaciones médicas y asociadas a cirugía en los pacientes programados (aneurismas no rotos).

El resumen de estas complicaciones se detalla en la Tabla 3:

Tabla 3. Complicaciones presentadas en grupo de hemorragia subaracnoidea	
Hidrocefalia n (%)^a	5 (23.8%)
Vasoespasmó n (%)^a	11 (52.4%)
Defunciones n (%)^a	5 (23.8%)

a: Los datos se presentan en frecuencia y porcentaje

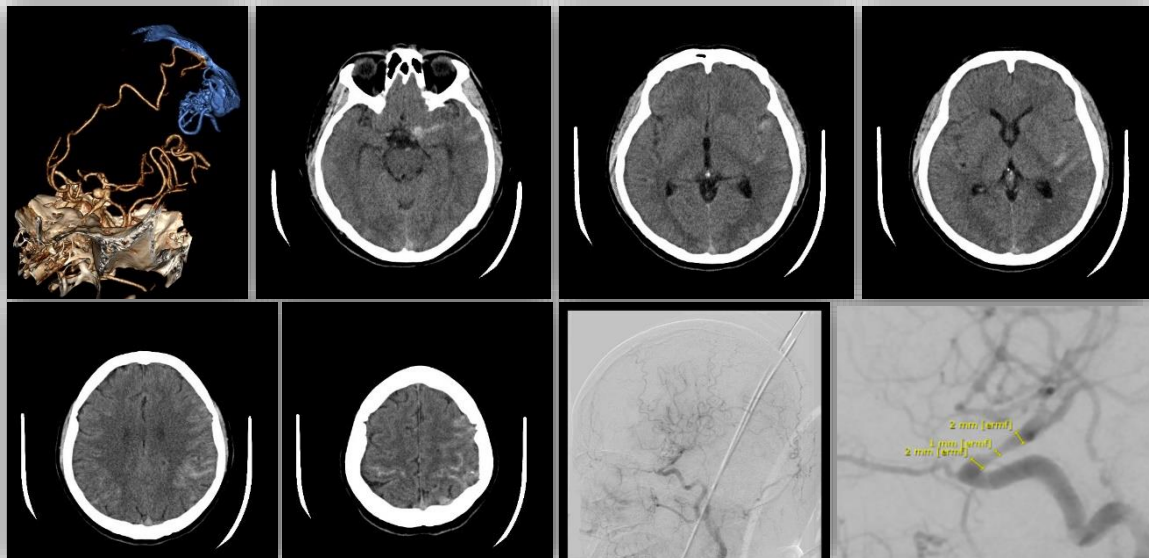


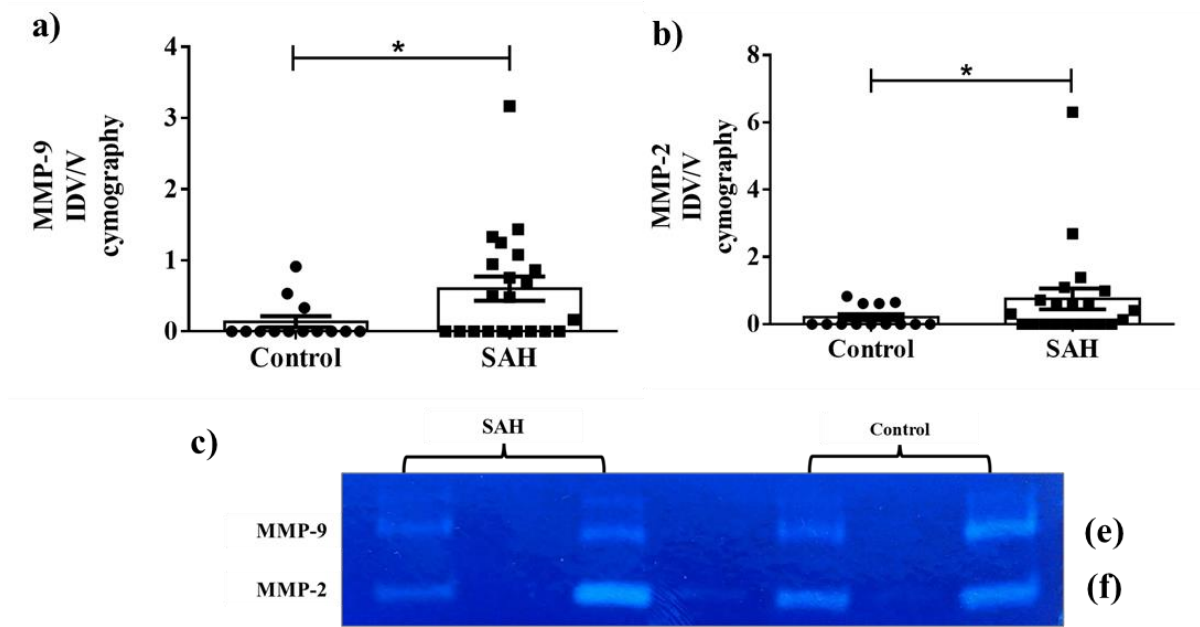
Figura 4: Aneurisma de la bifurcación de arteria carótida interna izquierda tipo I en relación con malformación arteriovenosa parietal ipsilateral asociada Spetzler Martin 2. Presenta datos radiográficos de vasoespasmó localizado en arteria carótida interna izquierda de aproximadamente 50% de estenosis del diámetro habitual del vaso (Grado I de Yamamoto).

En cuanto al comportamiento de los biomarcadores estudiados en LCR se encontraron los siguientes resultados.

La zimografía de las metaloproteasas mostraron que el grupo con HSA tiene mayor actividad en LCR de MMP9 comparado con el grupo control ($p < 0.0073$). En el 25 % de los casos con HSA no se detectó en el LCR la MMP, mientras que en los controles sólo en 2 casos se detectó, con significancia ($p = 0.032$) con la prueba estadística U de Mann Whitney.

Comportamiento detallado en la figura 5.

Figura 5. Comportamiento de la MMP-9 y MMP-2 medidos en LCR cisternal en ambos grupos.

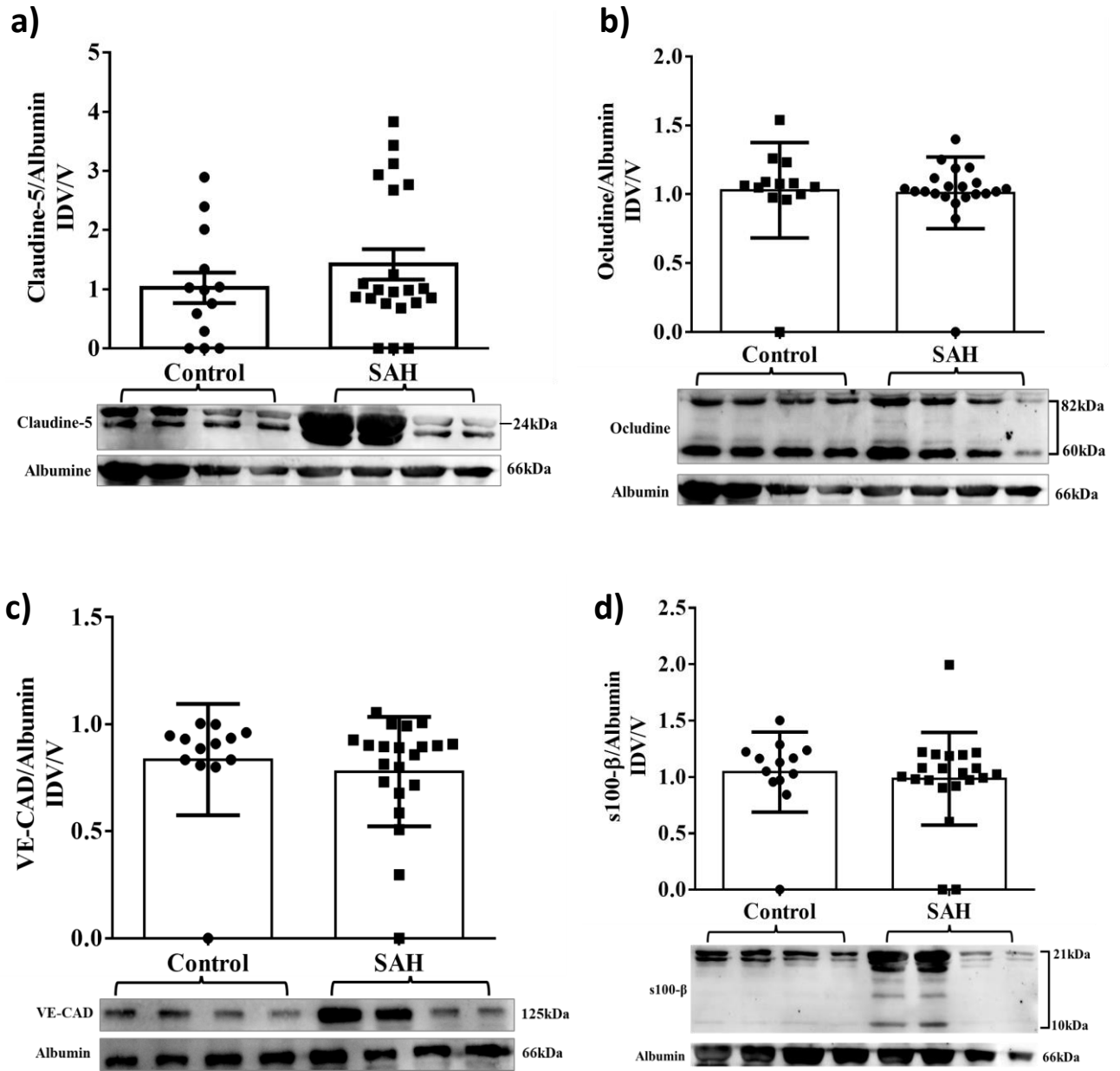


Los marcadores de disrupción de proteínas de barrera hematoencefálica mostraron que los pacientes con HSA tienen una mayor concentración en el LCR de la Claudina 5 comparado con el grupo control. Aunque la distribución fue homogénea en ambos grupos no hubo diferencias significativas. En 2 pacientes del grupo HSA no se observó la presencia de esta proteína. En cuanto a la concentración de Ocludina, la distribución en ambos grupos fue muy parecida y no hubo diferencias significativas.

En relación con las variables clínicas, sólo se encontró diferencia significativa en la concentración de proteína S-100 ($p < 0.04$) en correlación con la mortalidad presentada durante el internamiento hospitalario, con la prueba estadística U de Mann Whitney.

Dicho comportamiento se resume en la Figura 6.

Figura 6. Comportamiento de biomarcadores de disrupción de barrera hematoencefálica medidos en LCR cisternal en ambos grupos.



9. DISCUSIÓN

Existen escasos reportes de análisis de LCR cisternal en un punto proximal a la presencia de un aneurisma intracraneano roto y por lo tanto en el contexto clínico de hemorragia subaracnoidea, cuyo objetivo sea valorar las características del microambiente local; entre estos reportes, cabe mencionar la medición de citocinas proinflamatorias y moléculas vasoactivas como la endotelina⁹⁹. No existe un artículo que detalle el comportamiento de los biomarcadores de disrupción de barrera hematoencefálica propuestos en este trabajo. Los nuevos estudios que surjan de esta premisa deben tener en consideración que la concentración de metabolitos puede tener diferencias significativas en las diferentes localizaciones anatómicas de toma de muestra del LCR y esto limita su utilidad como biomarcadores hasta la realización de metaanálisis que comparen los hallazgos en los diferentes estudios¹⁰⁰.

El presente trabajo muestra que los casos que se presentan como HSA en su mayoría son del género femenino y la comorbilidad más frecuente fue la hipertensión arterial (>55%) (tabla 1).

La complicación de mayor riesgo asociada a HSA fue el vasoespasmio cerebral, presente en el 52.4% de los pacientes y llegando a producir al menos una lesión isquémica en 47.6% de ellos; hidrocefalia en 23.8% y la muerte durante la hospitalización en 4 pacientes (19%). Coincidiendo con los reportes internacionales de incidencia en este grupo de pacientes¹².

Un factor crítico para la tasa de mortalidad del 35% en pacientes que sufren de hemorragia subaracnoidea (HSA) es el desarrollo de edema cerebral global severo¹⁰¹. En estudios en humanos, la formación de edema cerebral se correlaciona con daño isquémico, déficits cognitivos, y mortalidad^{101,102}. El edema cerebral poshemorrágico es mayormente de origen vasogénico y resulta del daño a la integridad de la barrera hematoencefálica³¹. Los mecanismos subyacentes precisos que conducen a la disrupción de la barrera hematoencefálica a nivel neurovascular y la importancia de las células endoteliales para el desarrollo del edema cerebral vasogénico después de la HSA aún se desconocen. En este trabajo se pueden hacer varias aseveraciones respecto al papel que juega la disrupción de la barrera hematoencefálica en la enfermedad aneurismática.

En el caso de las proteínas de integridad de barrera hematoencefálica el más importante hallazgo fue la actividad de las MMPs (9 y 2) donde se encontró que a pesar de la variación entre los pacientes con SAH mostraron una mayor actividad en el LCR de manera significativa (Figura 5) en comparación con los controles que

también son pacientes con enfermedad aneurismática. Similar al trabajo de Triglia et al (2016)⁹², se mostró que las concentraciones en LCR de MMP-9 fueron significativamente mayores en pacientes con isquemia cerebral tardía que en aquellos sin isquemia cerebral tardía. En un estudio resultados similares al del presente trabajo mostraron que los niveles de expresión de MMP-9 en suero de pacientes con hemorragia subaracnoidea eran mayores que los pacientes sin hemorragia, lo que indica que el incremento en la expresión de MMP-9 se correlaciona con la ruptura aneurismática^{102,103}, lo cual traducido para efectos prácticos representa la lisis de colágeno IV de la lámina basal del endotelio de la barrera hematoencefálica.

El mecanismo de acción de las MMP en la formación de aneurismas se ha atribuido en gran medida a los efectos proteolíticos sobre las proteínas de matriz extracelular y al posterior debilitamiento de la pared arterial. Se ha observado también que la MMP-2 tiene la mayor actividad elastolítica y es producida principalmente por el músculo liso vascular y los fibroblastos (Wall et al., 2003)¹⁰⁵. Adicionalmente se conoce que MMP-2 y MMP-9 tienen efectos inhibitorios adicionales de sobre el mecanismo dependiente de Ca²⁺ de la contracción de músculo liso vascular que pueden desempeñar un papel en el desarrollo temprano del aneurisma (Chew et al., 2004)¹⁰⁶. La mayor actividad de estas MMP9 y 2 se presentó en los aneurismas rotos en la cohorte de estudio del presente trabajo; lo cual indica su papel en esta patología, pero no en la formación del vasoespasmo después de hemorragia subaracnoidea. La MMP-9 generalmente se considera una forma de zimógeno, y muchas células en el cerebro pueden secretar zimógeno MMP-9¹⁰⁷.

La activación del zimógeno puede conducir a la degradación de la matriz extracelular en el cerebro¹⁰⁸. Se ha demostrado en otro tipo de aneurismas que la MMP-9 es un inhibidor más potente de la contracción arterial que la MMP-2, consistente con la expresión dominante de MMP-9 en la pared arterial (Sakalihan et al., 1996). La función contráctil del músculo liso arterial puede contribuir a la integridad estructural de la pared arterial y limitar su tendencia a dilatarse en respuesta a las fuerzas pulsátiles generadas con cada ciclo cardíaco. Es remarcable que exista cierta cantidad de MMP medible en los controles con enfermedad aneurismática no rota; esto podría indicar que la enfermedad aneurismática cursa *per se* con disrupción de la barrera hematoencefálica en etapas tempranas.

En el presente estudio se mostró que de las proteínas de uniones endoteliales estrechas que forman parte de la barrera hematoencefálica estudiadas, la Claudina 5 muestra un mayor nivel en LCR en los pacientes con hemorragia subaracnoidea, sin embargo no se observaron diferencias significativas comparado con los controles, de igual forma la Ocludina y VE-Cadherin que forman parte de las uniones

estrechas entre célula-célula; y que son estructuras dinámicas que pueden ser alteradas por múltiples vías. Puede haber modificaciones de proteínas, incluida la fosforilación, metilación, palmitoilación y glucosilación¹⁰⁹. Tales modificaciones pueden afectar las interacciones proteína: proteína alterando la permeabilidad de la barrera. Si bien el papel de algunos de estos tipos de regulación ha sido examinado con cierto detalle en condiciones inflamatorias y condiciones isquémicas, el papel de tales procesos en la hemorragia cerebral no ha sido examinada en profundidad con la mayoría de los estudios.

Por otro lado, en estudios en modelos animales de hemorragia subaracnoidea la apertura de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica se produce inmediatamente después de inducida la hemorragia, la brecha fue mayor entre 3 y 72 h después de la misma. Estos resultados indicaron que el desensamble de uniones estrechas causado condujo al aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. De igual forma se observó en homogenados de tejido cerebral que la expresión de Zo-1 y Ocludina disminuyó significativamente después de SAH, con la expresión más baja de valores a las 3 y 72 h, en la mayoría de los estudios la constante es que se reducen en tejido los niveles de proteínas de las uniones estrechas, en el caso del presente trabajo observamos lo contrario, un aumento de los niveles de proteínas Clau-5, ocludina y VE-CAD en el LCR lo que significa que la separación de las uniones de estas proteínas son vertidas a las cisternas de LCR y por consiguiente se pueden detectar mediante la toma de muestra en estos sitios. No observamos correlación de estas proteínas con el tiempo de evolución y la toma de la muestra. La degradación de Zo-1 y Ocludina en la unión endotelial estrecha puede facilitar la fuga capilar responsable del aumento de la permeabilidad de barrera hematoencefálica (Fujii et al. 2012; Kondo et al. 2004). También se debe considerar que el incremento en la MMPs afecte los niveles de claudina-5 y ocludina y VE-CAD que son sustratos para metaloproteinasas de matriz (MMP)¹⁰⁹.

La desventaja del estudio en pacientes es el poco control de las variables como el tiempo de la toma de muestra, que en nuestro estudio no se relacionó con los niveles de proteínas detectados en el LCR.

En relación S-100B, no se encontró diferencias entre el grupo SAH y el grupo control, sin embargo, se observó una tendencia a tener mayores niveles de S-100B, y en relación con la mortalidad, los pacientes que tuvieron los niveles más elevados fueron los que fallecieron.

Adicionalmente en el presente trabajo se evaluaron los niveles de estas proteínas normalizándose con la albumina presente en el LCR que le da más rigor a los resultados. Sin embargo, faltan estudios con otras proteínas involucradas.

En conclusión. Estudiamos biomarcadores que nos indicaran daño a la barrera hematoencefálica pos HSA, las proteínas estudiadas estuvieron presentes en el LCR de pacientes con HSA con niveles detectables, sin embargo se observó que los controles utilizados (pacientes con aneurismas no rotos) también mantienen niveles parecidos a los pacientes con HSA lo que no reflejo diferencias significativas, solo las MMP 9 y 2 fueron los marcadores de disrupción a la barrera hematoencefálica cuya concentración fue mayor en los pacientes con HSA, asimismo, hubo correlación con la proteína S-100B y la mortalidad por HSA; con ello señalamos que esta proteína y las MMPs constituye un útil método bioquímico no invasivo para el evaluación de la severidad neurológica y daño a la barrera hematoencefálica y sugerimos que la enfermedad aneurismática cursa *per se* con disrupción de la barrera hematoencefálica en estadios tempranos. Sin embargo, los mecanismos de incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica después de HSA todavía no se entienden completamente y necesitan ser más estudiados.

BIBLIOGRAFIA

1. Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ.* 1976;54(5):541-553.
2. Chiquete E, Ruiz-Sandoval JL, Murillo-Bonilla LM, et al. Egresos por enfermedad vascular cerebral aguda en instituciones públicas del sector salud de México: Un análisis de 5.3 millones de hospitalizaciones en 2010. *Rev Mex Neurocienc.* 2012;13(5):252-258.
3. Cantú-Brito C, Ruiz-Sandoval JL, Chiquete E, et al. Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Rev Mex Neurocienc.* 2011;12(5):224-234.
4. De M, Hoy-Gutiérrez J, González-Figueroa E, Kuri-Morales P. Epidemiología de la enfermedad cerebrovascular. 1993;(177):223-229.
5. Carlos CB, Majersik JJ, Sánchez BN, et al. Vigilancia epidemiológica del ataque vascular cerebral en una comunidad Mexicana: Diseño de un proyecto poblacional para el estudio de las enfermedades cerebrovasculares en México. *Rev Mex Neurocienc.* 2010;11(2):128-135.
6. GINEBRA O 1971. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, SERIE DE INFORMES TECNICOS N° 469. ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES: PREVENCION, TRATAMIENTO Y REHABILITACION.
7. Vates GE, Zabramski JM, Spetzler RF, Lawton MT. Chapter 67 - Intracranial Aneurysms. In: Mohr JP, Choi DW, Grotta JC, Weir B, Wolf PABT-S (Fourth E, eds. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004:1279-1335. doi:https://doi.org/10.1016/B0-44-306600-0/50076-6
8. Vergouwen MDI, Vermeulen M, van Gijn J, 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. doi:10.1161/STROKEAHA.110.589275
9. Ruiz-Sandoval JL, Cantu C, Chiquete E, et al. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage in a Mexican multicenter registry of cerebrovascular disease: the RENAMEVASC study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2009;18(1):48-55. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.09.019
10. Ruiz-Sandoval JL, Cantú C, Chiquete E, et al. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in a Mexican Multicenter Registry of Cerebrovascular Disease: The RENAMEVASC Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2009;18(1):48-55. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.09.019
11. B. BJ, M. GI, Lorraine G. Cortical Blood Flow and Cerebral Perfusion Pressure in a New Noncraniotomy Model of Subarachnoid Hemorrhage in the Rat. *Stroke.* 1995;26(6):1086-1092. doi:10.1161/01.STR.26.6.1086
12. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, et al. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1998;42(2):352.
13. Asano T, Sano K. Pathogenetic role of no-reflow phenomenon in experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *J Neurosurg.* 1977;46(4):454-466. doi:10.3171/jns.1977.46.4.0454
14. Jackowski A, Crockard A, Burnstock G, Russell RR, Kristek F. The Time Course of Intracranial Pathophysiological Changes following Experimental Subarachnoid Haemorrhage in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10(6):835-849. doi:10.1038/jcbfm.1990.140
15. Nornes H. Cerebral arterial flow dynamics during aneurysm haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien).*

1978;41(1):39-48. doi:10.1007/BF01809135

16. Fisher CM. Clinical syndromes in cerebral thrombosis, hypertensive hemorrhage, and ruptured saccular aneurysm. *Clin Neurosurg*. 1975;22:117-147.
17. Dorsch N, Branston NM, Symon L, Jakubowski J. Intracranial pressure changes following primate subarachnoid haemorrhage. *Neurol Res*. 1989;11(4):201-204. doi:10.1080/01616412.1989.11739893
18. Kamiya K, Kuyama H, Symon L. An experimental study of the acute stage of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1983;59(6):917-924. doi:10.3171/jns.1983.59.6.0917
19. Grote E, Hassler W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1988;22(4):654-661.
20. Furuichi S, Endo S, Haji A, Takeda R, Nisijima M, Takaku A. Related changes in sympathetic activity, cerebral blood flow and intracranial pressure, and effect of an alpha-blocker in experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 1999;141(4):414-415.
21. Ohkuma H, Itoh K, Shibata S, Suzuki S. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurosurgery*. 1997;41(1):230-236.
22. Dietrich HH, Dacey RGJ. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 2000;46(3):517-530.
23. Ames 3rd A, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*. 1968;52(2):437-453.
24. Sehba FA, Mostafa G, Knopman J, Friedrich V, Bederson JB. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2004;101(4):633-640. doi:10.3171/jns.2004.101.4.0633
25. Fischer EG, Ames A 3rd, Lorenzo A V. Cerebral blood flow immediately following brief circulatory stasis. *Stroke*. 1979;10(4):423-427.
26. Takahashi S. [Correlation of vasospasm and intracranial metabolism under experimental subarachnoid hemorrhage--Part 1. In reference with the acid-base-balance of cerebral blood and cerebrospinal fluid]. *No To Shinkei*. 1978;30(7):777-787.
27. Uhl E, Lehmborg J, Steiger H-J, Messmer K. Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery*. 2003;52(6):1307.
28. Handa Y, Kubota T, Kaneko M, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the cerebral artery following subarachnoid haemorrhage in rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 1995;132(1):92-97. doi:10.1007/BF01404854
29. Polin RS, Bavbek M, Shaffrey ME, et al. Detection of soluble E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1998;89(4):559-567. doi:10.3171/jns.1998.89.4.0559
30. Stanley JR, Woodley DT, Katz SI, Martin GR. Structure and function of basement membrane. *J Invest Dermatol*. 1982;79 Suppl 1:69s-72s.
31. Doczi T. The pathogenetic and prognostic significance of blood-brain barrier damage at the acute stage of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. Clinical and experimental studies. *Acta Neurochir (Wien)*. 1985;77(3-4):110-132.
32. Symon L. Disordered cerebro-vascular physiology in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 1978;41(1-3):7-22.
33. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury. *J Neurotrauma*. 1995;12(5):833-842. doi:10.1089/neu.1995.12.833

34. Sehba FA, Bederson JB. Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 2006;28(4):381-398. doi:10.1179/016164106X114991
35. Schneider UC, Davids A-M, Brandenburg S, et al. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol.* 2015;130(2):215-231. doi:10.1007/s00401-015-1440-1
36. Diringer MN, Bleck TP, Claude Hemphill J 3rd, et al. Critical care management of patients following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recommendations from the Neurocritical Care Society's Multidisciplinary Consensus Conference. *Neurocrit Care.* 2011;15(2):211-240. doi:10.1007/s12028-011-9605-9
37. Marzatico F, Gaetani P, Silvani V, Lombardi D, Sinforiani E, Rodriguez y Baena R. Experimental isobaric subarachnoid hemorrhage: regional mitochondrial function during the acute and late phase. *Surg Neurol.* 1990;34(5):294-300.
38. Gewirtz RJ, Dhillion HS, Goes SE, DeAtley SM, Scheff SW. Lactate and free fatty acids after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* 1999;840(1-2):84-91.
39. Saveland H, Nilsson OG, Boris-Moller F, Wieloch T, Brandt L. Intracerebral Microdialysis of Glutamate and Aspartate Two Vascular Territories after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery.* 1996;38(1):12-20.
40. Fein JM. Brain energetics and circulatory control after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1976;45(5):498-507. doi:10.3171/jns.1976.45.5.0498
41. Harada S, Kamiya K, Masago A, Iwata A, Yamada K. Subarachnoid hemorrhage induces c-fos, c-jun and hsp70 mRNA expression in rat brain. *Neuroreport.* 1997;8(15):3399-3404.
42. Matz P, Turner C, Weinstein PR, Massa SM, Panter SS, Sharp FR. Heme-oxygenase-1 induction in glia throughout rat brain following experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* 1996;713(1-2):211-222.
43. Matz PG, Copin JC, Chan PH. Cell death after exposure to subarachnoid hemolysate correlates inversely with expression of CuZn-superoxide dismutase. *Stroke.* 2000;31(10):2450-2459.
44. McD Anderson R, Opeskin K. Timing of early changes in brain trauma. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998;19(1):1-9.
45. Matz PG, Fujimura M, Chan PH. Subarachnoid hemolysate produces DNA fragmentation in a pattern similar to apoptosis in mouse brain. *Brain Res.* 2000;858(2):312-319.
46. Simeone FA, Ryan KG, Cotter JR. Prolonged experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg.* 1968;29(4):357-366. doi:10.3171/jns.1968.29.4.0357
47. Lombard JH, Liu Y, Fredricks KIMT, et al. Electrical and mechanical responses of rat middle cerebral arteries to reduced P O 2 and prostacyclin. 1999:509-516.
48. Allen GS, Henderson LM, Chou SN, French LA. Cerebral arterial spasm. 1. In vitro contractile activity of vasoactive agents on canine basilar and middle cerebral arteries. *J Neurosurg.* 1974;40(4):433-441. doi:10.3171/jns.1974.40.4.0433
49. Papadopoulos SM, Gilbert LL, Webb RC, D'Amato CJ. Characterization of contractile responses to endothelin in human cerebral arteries: implications for cerebral vasospasm. *Neurosurgery.* 1990;26(5):810-815.
50. Asano T. Asano, %chiro Ekegaki, Shin-i&i Satoh, Yashi Ken&i Sugita ' and Hiroyoshi asato Shibuya I,. 1989.
51. Sehba FA, Ding WH, Cheresnev I, Bederson JB. Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1999;30(9):1955-

1961.

52. Vollrath B, Chan P, Findlay M, Cook D. Lazaroids and deferoxamine attenuate the intracellular effects of oxyhaemoglobin in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 1995;30(4):619-626.
53. Endo S, Suzuki J. Experimental cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: development and degree of vasospasm. *Stroke*. 1977;8(6):702-707.
54. Echlin F. Experimental vasospasm, acute and chronic, due to blood in the subarachnoid space. *J Neurosurg*. 1971;35(6):646-656. doi:10.3171/jns.1971.35.6.0646
55. Kapp J, Mahaley MSJ, Odom GL. Cerebral arterial spasm. 2. Experimental evaluation of mechanical and humoral factors in pathogenesis. *J Neurosurg*. 1968;29(4):339-349. doi:10.3171/jns.1968.29.4.0339
56. MATTHEWS WF, FROMMEYER WBJ. The in vitro behavior of erythrocytes in human cerebrospinal fluid. *J Lab Clin Med*. 1955;45(4):508-515.
57. Massicotte EM, Del Bigio MR. Human arachnoid villi response to subarachnoid hemorrhage: possible relationship to chronic hydrocephalus. *J Neurosurg*. 1999;91(1):80-84. doi:10.3171/jns.1999.91.1.0080
58. Nina P, Schisano G, Chiappetta F, et al. A study of blood coagulation and fibrinolytic system in spontaneous subarachnoid hemorrhage. Correlation with hunt-hess grade and outcome. *Surg Neurol*. 2001;55(4):197-203.
59. Hindersin P, Heidrich R, Endler S. Haemostasis in cerebrospinal fluid. Basic concept of antifibrinolytic therapy of subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1984;34:1-77.
60. Brouwers PJ, Dippel DW, Vermeulen M, Lindsay KW, Hasan D, J van G. Amount of blood on computed tomography as an independent predictor after aneurysm rupture. *Stroke*. 1993;24(6):809-814. doi:10.1161/01.STR.24.6.809
61. Sonobe M, Suzuki J. Vasospasmogenic substance produced following subarachnoid haemorrhage, and its fate. *Acta Neurochir (Wien)*. 1978;44(1-2):97-106.
62. Okwuasaba F, Cook D, Weir B. Changes in vasoactive properties of blood products with time and attempted identification of the spasmogens. *Stroke*. 1981;12(6):775-780.
63. Schwartz AY, Sehba FA, Bederson JB. Decreased nitric oxide availability contributes to acute cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2000;47(1):205-208.
64. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*. 1986;201(2):291-295.
65. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(3-4):291-316.
66. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78(6):915-918.
67. Zhang ZG, Chopp M, Gautam S, et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res*. 1994;654(1):85-95.
68. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15(3):378-384. doi:10.1038/jcbfm.1995.47
69. Leist M, Nicotera P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res*. 1998;239(2):183-201. doi:10.1006/excr.1997.4026
70. Sehba FA, Schwartz AY, Chereshev I, Bederson JB. Acute Decrease in Cerebral Nitric Oxide Levels

after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(3):604-611.
doi:10.1097/00004647-200003000-00018

71. Akopov SE, Zhang L, Pearce WJ. Mechanisms of platelet-induced angiospastic reactions: potentiation of calcium sensitivity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997;75(7):849-852.
72. Denton IC, Robertson JT, Dugdale M. An assessment of early platelet activity in experimental subarachnoid hemorrhage and middle cerebral artery thrombosis in the cat. *Stroke.* 1971;2(3):268-272.
73. Gaetani P, Tancioni F, Grignani G, et al. Platelet derived growth factor and subarachnoid haemorrhage: a study on cisternal cerebrospinal fluid. *Acta Neurochir (Wien).* 1997;139(4):319-324.
74. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Dynamic platelet accumulation at the site of the occluded middle cerebral artery and in downstream microvessels is associated with loss of microvascular integrity after embolic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 2001;912(2):181-194.
75. Tanabe Y, Sakata K, Yamada H, Ito T, Takada M. Cerebral vasospasm and ultrastructural changes in cerebral arterial wall. An experimental study. *J Neurosurg.* 1978;49(2):229-238.
doi:10.3171/jns.1978.49.2.0229
76. Smith CC, Stanyer L, Cooper MB, Betteridge DJ. Platelet aggregation may not be a prerequisite for collagen-stimulated platelet generation of nitric oxide. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473(2-3):286—292. doi:10.1016/s0304-4165(99)00202-0
77. Sercombe R, Dinh YRT, Gomis P. Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *Jpn J Pharmacol.* 2002;88(3):227-249.
78. Gaetani P, Marzatico F, y Baena RR, et al. Arachidonic acid metabolism and pathophysiologic aspects of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 1990;21(2):328-332. doi:10.1161/01.STR.21.2.328
79. Kamezaki T, Yanaka K, Nagase S, Fujita K, Kato N, Nose T. Increased levels of lipid peroxides as predictive of symptomatic vasospasm and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2002;97(6):1302-1305. doi:10.3171/jns.2002.97.6.1302
80. Marzatico F, Gaetani P, Tartara F, et al. Antioxidant status and alpha1-antiproteinase activity in subarachnoid hemorrhage patients. *Life Sci.* 1998;63(10):821-826.
81. Vivancos J, Gilo F, Frutos R, et al. Guía de actuación clínica en la hemorragia subaracnoidea. Sistemática diagnóstica y tratamiento. *Neurología.* 2016;31(9):649-650.
doi:10.1016/j.nrl.2014.10.002
82. Rezae O, Gharagozli K. Biochemical Markers in Neurocritical Care. *J Cell Mol Anesth.* 2016;1(3):115-119.
83. Sarrafzadeh A, Copin J-C, Bengualid DJ, et al. Matrix metalloproteinase-9 concentration in the cerebral extracellular fluid of patients during the acute phase of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 2012;34(5):455-461. doi:10.1179/1743132812Y.0000000018
84. del Zoppo GJ. The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1207:46-49. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05760.x
85. Mehta V, Russin J, Spirtos A, et al. Matrix Metalloproteinases in Cerebral Vasospasm following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurol Res Int.* 2013;2013:943761.
doi:10.1155/2013/943761
86. H.-Y. CS, Po-Shun L, G. KR, et al. Plasma-Type Gelsolin Is Decreased in Human Blood and Cerebrospinal Fluid After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.* 2011;42(12):3624-3627.
doi:10.1161/STROKEAHA.111.631135
87. Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. Matrix metalloproteinases

- regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2001;15(12):2230-2240. doi:10.1096/fj.01-0178com
88. Feiler S, Plesnila N, Thal SC, Zausinger S, Scholler K. Contribution of matrix metalloproteinase-9 to cerebral edema and functional outcome following experimental subarachnoid hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2011;32(3):289-295. doi:10.1159/000328248
 89. Sun Q, Wu W, Hu Y-C, et al. Early release of high-mobility group box 1 (HMGB1) from neurons in experimental subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *J Neuroinflammation*. 2014;11:106. doi:10.1186/1742-2094-11-106
 90. Wang Z, Fang Q, Dang B-Q, et al. Potential contribution of matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42(1):14-20.
 91. Wu H, Zhang Z, Hu X, et al. Dynamic changes of inflammatory markers in brain after hemorrhagic stroke in humans: a postmortem study. *Brain Res*. 2010;1342:111-117. doi:10.1016/j.brainres.2010.04.033
 92. Triglia T, Mezzapesa A, Martin JC, et al. Early matrix metalloproteinase-9 concentration in the first 48 h after aneurysmal subarachnoid haemorrhage predicts delayed cerebral ischaemia. *Eur J Anaesthesiol*. 2016;33(9):662-669. doi:10.1097/EJA.0000000000000494
 93. Höllig A, Stoffel-Wagner B, Clusmann H, Veldeman M, Schubert GA, Coburn M. Time courses of inflammatory markers after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and their possible relevance for future studies. *Front Neurol*. 2017;8(DEC):1-9. doi:10.3389/fneur.2017.00694
 94. Matz PG, Fujimura M, Lewen A, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Increased cytochrome c-mediated DNA fragmentation and cell death in manganese-superoxide dismutase-deficient mice after exposure to subarachnoid hemolysate. *Stroke*. 2001;32(2):506-515.
 95. Yan J, Li L, Khatibi NH, et al. Blood-brain barrier disruption following subarachnoid hemorrhage may be facilitated through PUMA induction of endothelial cell apoptosis from the endoplasmic reticulum. *Exp Neurol*. 2011;230(2):240-247. doi:10.1016/j.expneurol.2011.04.022
 96. Brown RC, Davis TP. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*. 2002;33(6):1706-1711.
 97. Chen D, Wei XT, Guan JH, et al. Inhibition of c-jun N-terminal kinase prevents blood-brain barrier disruption and normalizes the expression of tight junction proteins claudin-5 and ZO-1 in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 2012;154(8):1469-1476. doi:10.1007/s00701-012-1328-y
 98. Eden S V., Meurer WJ, Sánchez BN, et al. Gender and ethnic differences in subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2008;71(10):731-735. doi:10.1212/01.wnl.0000319690.82357.44
 99. Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Grignani G, Spanu G, Pacchiarini L, Paoletti P. Endothelin and aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a study of subarachnoid cisternal cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(1):66-72. doi:10.1136/jnnp.57.1.66
 100. Chou SH, Macdonald RL, Keller E; Unruptured Intracranial Aneurysms and SAH CDE Project Investigators. Biospecimens and Molecular and Cellular Biomarkers in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Studies: Common Data Elements and Standard Reporting Recommendations. *Neurocrit Care*. 2019;30(Suppl 1):46-59. doi:10.1007/s12028-019-00725-4
 101. Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, Du EY, Connolly ES, Mayer SA. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke*. 2002;33(5):1225-32.

102. Mocco J, Prickett CS, Komotar RJ, Connolly ES, Mayer SA. Potential mechanisms and clinical significance of global cerebral edema following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Focus.* 2007;22(5):E7.
103. Li Z, Liang G, Ma T, Li J, Wang P, Liu L, Yu B, Liu Y and Xue Y: Blood-brain barrier permeability change and regulation mechanism after subarachnoid hemorrhage. *Metab Brain Dis* 30: 597-603, 2015.
104. Chen T, Wang W, Li JR, Xu HZ, Peng YC, Fan LF, Yan F, Gu C, Wang L and Chen G: PARP inhibition attenuates early brain injury through NF- κ B/MMP-9 pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* 1644: 32-38, 2016.
105. Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, Murphy G. Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2003; 149:13–16.
106. Chew DK, Conte MS, Khalil RA. Matrix metalloproteinase-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction. *J Vasc Surg.* 2004; 40:1001–1010.
107. Kurogi R, Kikkawa Y, Matsuo S, Nakamizo A, Mizoguchi M and Sasaki T: Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 contributes to restoration of the extracellular matrix in the rabbit basilar artery during cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* 1616: 26-36, 2015.15.
108. Höllig A, Thiel M, Stoffel-Wagner B, Coburn M and Clusmann H: Neuroprotective properties of dehydroepiandrosterone-sulfate and its relationship to interleukin 6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A prospective cohort study. *Crit Care* 19: 231, 2015
109. Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, et al. Junctional proteins of the blood-brain barrier: new insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers* 2016; 4:e1154641.
- 110.



14. ANEXOS.

14.1 Carta de consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Coordinación de Investigación en Salud

Comisión Nacional de Investigación Científica

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre de protocolo:

“Estudio de la expresión en líquido cefalorraquídeo de ocludina, claudina 5 y metaloproteinasa 9 como biomarcadores de daño a la barrera hematoencefálica en pacientes con hemorragia subaracnoidea.”

Paciente HSA _____.

Lugar y Fecha: _____.

No. de registro: _____.

Justificación y objeto del estudio: Le estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en el servicio de Neurocirugía y la Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas, del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

El objetivo del estudio es conocer las concentraciones de algunas sustancias en su líquido cefalorraquídeo durante una hemorragia como la que padece su familiar en estos momentos y saber si pueden relacionarse con el desarrollo de vasoespasmo, esto es el estrechamiento de las arterias del cerebro cerca del sitio en donde se originó el sangrado por ruptura de un aneurisma cerebral (una de las complicaciones de la propia hemorragia), y si se relaciona con el buen o mal funcionamiento de su cerebro. Esta información podría ser valiosa para saber si un paciente con sangrado cerebral por ruptura de un aneurisma tiene mayores o menores concentraciones de estas sustancias en su líquido cefalorraquídeo y saber si tienen mayor riesgo de presentar o no las complicaciones mayores de la enfermedad, para saberlo antes de que se presente, y si fuera el caso, darle el tratamiento para evitarlo.

Usted ha sido invitado(a) a participar en este estudio porque usted o su familiar presenta un cuadro clínico compatible con sangrado cerebral por ruptura de aneurisma. Al igual que usted, otras 50 personas más de este hospital, con el mismo cuadro, serán o han sido invitadas a participar en este estudio.

Su participación es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

Procedimientos

a) Su participación implica responder a un cuestionario. De tal forma que se le pedirá que responda sobre algunos datos personales como; lugar de residencia, ocupación, alimentación, diagnóstico, antecedentes familiares de la enfermedad e historial médico. Las entrevistas se llevan a cabo en forma individual y confidencial.

b) Permitir la extracción de una muestra de líquido cefalorraquídeo para la medición de sustancias (MMP 9, Claudinha 5, ZO-1 y VE Cadherina), por lo que se le solicitará la donación de líquido cefalorraquídeo equivalente a una cucharada cafetera (que equivale a 3 ml) en 1 ocasión. La muestra será extraída por aspiración cisternal directa durante el procedimiento quirúrgico resolutivo de la enfermedad aneurismática.

c) **Posibles riesgos y molestias.** Los riesgos potenciales que implica su participación en este estudio son mínimos. Pueden presentarse ciertas molestias asociadas al procedimiento quirúrgico per se. Para la toma de líquido cefalorraquídeo se utilizarán únicamente agujas y jeringas estériles y desechables.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio. Usted no recibirá ningún beneficio al participar en este estudio. El beneficio será contribuir a la generación de nuevo conocimiento que se podría aplicar en el tratamiento futuro de pacientes con hemorragia cerebral debido a la ruptura de un aneurisma.

Resultados o información nueva sobre alternativas de tratamiento. Durante el transcurso de este estudio, le informaremos de cualquier hallazgo nuevo (ya sea bueno o malo) que sea importante para el tratamiento de su enfermedad y que pueda modificar su decisión de participar o continuar participando en este estudio.

Participación o retiro. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento y este hecho no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS. En caso de que usted desee que se deseche su muestra, puede contactar al doctor Rabindranath García López en cualquier momento y solicitar el retiro y eliminación de su muestra. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que aceptó participar hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no desea hacerlo.

Privacidad y confidencialidad. Toda la información que usted nos proporcione será de carácter estrictamente confidencial, es decir, será utilizado únicamente por los investigadores del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito, incluyendo la muestra de sangre. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases

de datos. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo, si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia).

Colección de material biológico

Ya que se le ha solicitado la toma de muestras biológicas, le pedimos su autorización tanto para la toma de la muestra, como para la utilización de esta en este u otros estudios posteriores.

- No autorizo que se tome la muestra.
- Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros

Personas para contactar en caso de dudas y aclaraciones sobre el estudio.

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 7:30 a 17:00 h, de lunes a viernes con el Dr. Rabindranath García López, que es el investigador responsable del estudio, al teléfono directo 55782284 del Hospital de Especialidades, CMN, Siglo XXI de 8.00 a 17 Hrs.

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21216, de 9 a 16:00 h; o si así lo prefiere al correo electrónico: comisioneticainterno@gmail.com o comité.eticainv@imss.gob.mx La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de nuestra participación en el estudio.

Sus firmas indican su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.
Nombre y firma de los participantes.

Nombre y firma del paciente o representante legal

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección
relación y firma

Nombre, dirección,
relación y firma

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

14.2 CRONOGRAMA

	SEPT 2019- JULIO 2020	MAR 2020	ABRIL 2020	JULIO- SEPT 2020	OCT- NOV 2020	DIC- ENE 2021
ELABORACION DE PROTOCOLO		XX				
ENVIO DE PROTOCOLO A COMITÉ EVALUADOR Y AUTORIZACIÓN			XX			
RECOLECCION DE LA INFORMACION	XX					
ANALISIS DE RESULTADOS				XX		
REDACCION DE LA TESIS					XX	
ENTREGA DE TESIS						XX