

84



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## FACULTAD DE QUIMICA

*EVALUACION DEL SISTEMA FIBRINOLITICO E INHIBIDORES DE LA COAGULACION EN RECIEN NACIDOS DE TERMINO Y PRETERMINO.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACO BIOLOGO

P R E S E N T A:

XOCHITL MAURICIO VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. HECTOR BAPTISTA GONZALEZ



MEXICO, D. F.



2001

EXAMENES INTERNACIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

229429



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado

Presidente      Dr. JOSE LUIS DOMINGUEZ TORIZ  
Vocal            Prof. RAUL NIETO CAMACHO  
Secretario      Dr. HECTOR BAPTISTA GONZALEZ  
1er. Suplente   Prof. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS  
2 do. Suplente   Prof. AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO

Sitio donde se desarrolló el tema  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

Nombre completo y firma del asesor del tema

DR. HECTOR BAPTISTA GONZALEZ



Nombre completo y firma del sustentante

XOCHITL MAURICIO VILLEGAS



AGRADECIMIENTO

A MIS PADRES POR LA EDUCACIÓN QUE ME DIERON  
GRACIAS

A MI ESPOSO POR SU APOYO Y ESTIMULO

A MI HIJA GUADALUPE

A MIS SUEGROS POR SU APOYO

A MIS HERMANOS

AL DR. HECTRO BAPTISTA POR SU APOYO EN LA REALIZACION DE ESTA  
TESIS

## INDICE

Síntesis del proyecto _____	3
Introducción _____	4
Objetivo _____	5
Mecanismo Hemostático Generalidades. _____	6
Mecanismo Hemostático en el recién nacido _____	12
Fases en el estudio de la Hemostasia _____	19
Métodos de laboratorio e instrumentación En la evaluación de la Hemostasia _____	23
Metodología _____	33
Resultados _____	35
Discusión _____	42
Bibliografía _____	45

## **SINTESIS DEL PROYECTO**

Con el objeto de evaluar el sistema fibrinolítico e inhibidores de la coagulación en el periodo neonatal se realizó un estudio prospectivo, descriptivo y transversal en muestras de recién nacidos que cumplieron con los criterios de selección para ser aceptados en el presente estudio. Las muestras se recolectaron de sangre placentaria, puncionando a nivel de los vasos umbilicales. Para el análisis los neonatos se agruparon de acuerdo a su edad gestacional (pretérmino y término) y por peso. En total se estudiaron 57 neonatos (4 de pretérmino y 53 de término) evaluando Proteína C, Proteína S total y libre, Antitrombina III, Productos de degradación de la fibrina y fibrinógeno,  $\alpha$ 2-antiplasmina, Plasminógeno, inhibidor del activador tisular del plasminógeno, Dímeros D, plaquetas y volumen plaquetario medio.

## INTRODUCCIÓN

El sistema de hemostático mantiene la integridad vascular limitando la hemorragia y remodelando el vaso dañado una vez que los mecanismos de reparación tisular han cesado. Este sistema esta formado por dos subsistemas, *coagulación y fibrinólisis* los cuales funcionan equilibradamente manteniendo la sangre fluida. Contrario a lo que podría creerse el sistema de hemostático del recién nacido es eficaz pues no presentan complicaciones hemorrágicas espontáneas (8, 2). Pero al ser comparado con el adulto reflejan la profunda influencia de la edad gestacional y edad postnatal en la concentración y funcionalidad de los componentes de la hemostasia (1,5,9,11). Sin embargo se tiene un pobre conocimiento del desarrollo de la hemostasia en el recién nacido, algunos autores atribuyen este retraso a la dificultad en la obtención de las muestras sanguíneas como a los pequeños volúmenes de plasma disponible para realizar los ensayos.

Aunque el gran avance tecnológico de los últimos años nos permite contar con micro técnicas, encontramos escasos reportes sobre el sistema hemostático en esta etapa de la vida. En este estudio se evaluó la concentración de Proteína C, Proteína S libre y total, Antitrombina III, Plasminógeno,  $\alpha$ 2-Antiplasmina, Productos de degradación de la fibra y fibrinógeno, inhibidor del activador tisular del plasminógeno, Dímeros D, plaquetas y volumen plaquetario medio en una población de neonatos agrupados por edad gestacional (*pretérmino y término*). Encontrándose diferencias significativas entre estos dos grupos de neonatos.

## OBJETIVO

### OBJETIVO GENERAL

Describir las concentraciones de los inhibidores de la coagulación y sistema fibrinolítico en los recién nacidos

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Contrastar los valores de las proteínas de la fibrinólisis e inhibidores de la coagulación de acuerdo sexo, vía de nacimiento, edad gestacional y peso al nacer.
- Comparar los resultados de las concentraciones de las proteínas del sistema fibrinolítico e inhibidores de la coagulación entre grupos de pretérmino y término
- Comparar las concentraciones de las proteínas del sistema fibrinolítico e inhibidores de la coagulación en los neonatos con los valores normales en el adulto

## MECANISMOS HEMOSTÁTICOS

### GENERALIDADES

El sistema de hemostático mantiene la integridad vascular limitando la hemorragia y remodelando el vaso dañado una vez que los mecanismos de reparación tisular han cesado. El sistema de hemostático está formado por dos subsistemas *coagulación* y *fibrinólisis*, los cuales funcionan armónicamente involucrando células hemáticas circulantes, factores de la fase fluida de la hemostasia, factores fibrinolíticos y los reguladores del sistema. Normalmente, el sistema está en reposo pero se activa rápidamente ante una agresión vascular mediante respuestas altamente específicas.

### **HEMOSTASIA**

La hemostasia es un sistema fisiológico que detiene la salida de sangre, al sellar provisionalmente el sitio de daño vascular e iniciar posteriormente los mecanismos de reparación. El primer evento es la contracción vascular e inmediatamente se produce el coágulo plaquetario que requiere de una malla de fibrina para estabilizarse. Los tres mecanismos son necesarios para una hemostasia adecuada y cualquier alteración de ellos predispone a la hemorragia. Desde el punto de vista práctico la hemostasia se divide en dos fases: *la hemostasia primaria* (interacción vaso sanguíneo-plaquetas) es el cierre inmediato de la lesión vascular por vasoconstricción, adhesión y agregación plaquetaria, siendo solo temporal ya que la hemorragia puede seguir si el coágulo plaquetario fiable no se refuerza con una red de fibrina. Al fenómeno de formación de fibrina se le llama *hemostasia secundaria* y su función es mantener el tapón hemostático. (16,17,23,24)

### FASES DE LA HEMOSTASIA PRIMARIA

Cuando ocurre una lesión endotelial se desencadenan una serie de mecanismos cuya finalidad es obstruir la lesión con un tapón hemostático, inicialmente generado por plaquetas y posteriormente estabilizado por el polímero de fibrina durante el proceso de coagulación. Dichos mecanismos se ordenan en las

siguientes fases:1) Adhesión plaquetaria al subendotelio expuesto por el daño vascular; 2)Agregación plaquetaria primaria al activarse el complejo glucoreceptor IIb/IIIa permitiendo la unión entre las plaquetas; posteriormente ocurre la 3)Liberación de compuestos intraplaquetarios que provocan, 4)Agregación secundaria de nuevas plaquetas al tapón hemostático; 5) Consolidación y retracción del coágulo.(16,23)

### HEMOSTASIA SECUNDARIA

La hemostasia secundaria es un proceso que involucra múltiples enzimas, cofactores y superficies celulares que intervienen en la formación del coágulo insoluble. Las características de los factores de la coagulación se describen en el cuadro No 1. La formación de este coagulo insoluble de fibrina proviene de la conversión de una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno. La conversión es catalizada por la trombina la cual a su vez precede de la protrombina.

Cuadro No. 1  
Características de los factores de coagulación (16)

Factor		síntesis	PM (Kd)	Características de la proteína
Fibrinógeno	FI	Hígado	340	Dimérica
Protrombina	FII	Hígado	72	Dependiente de vitamina K
Factor tisular	FIII	Tejido extravascular	37	Proteína transmembranal
FV		Hígado	330	Cofactor de Fxa
FVII		Hígado	50	Dependiente de vitamina K
FVIII		Hígado/Células endoteliales	330	Cofactor del FIXa
FIX		Hígado	55	Dependiente de vitamina K
FX		Hígado	55	Dependiente de vitamina K
FXI		Hígado	260	Homodímero
FXII		Hígado	80	Una sola cadena
FXIII		Hígado	320	Tetramérica
Precalcicreína		Hígado	120	Monomérica
QAPM		Hígado	100	Monomérica

## FORMACIÓN DEL COAGULO DE FIBRINA

La principal función hemostática de la formación del coágulo de fibrina es proveer un apoyo estructural para la formación del trombo in vivo. lo que requiere de la conversión del fibrinógeno a fibrina. El fibrinógeno es un dímero donde cada monómero esta constituido por 3 cadenas distintas:  $\alpha$ A,  $\beta$ B y  $\gamma$ . De acuerdo a la estructura terciaria del fibrinógeno podemos considerar la existencia de 3 dominio. El nódulo central constituye el dominio correspondiente a los extremos amino-terminales (dominio E) y a los laterales se encuentran los dominios correspondientes a los extremos carboxi-terminales (dominio D). En la conversión de fibrinógeno a fibrina primero, se liberan dos fibrinopéptidos A (FPA) y dos B (FPB) mediante la acción de la trombina . formándose monómeros de fibrina La segunda etapa es la polimerización de los monómeros que se agregan espontáneamente formando fibrillas de fibrina. La tercera etapa es la formación de polímeros resistentes, paso que requiere del FXIII y calcio.

## **FIBRINOLISIS**

Aunque opuestos aparentemente, fibrinolisis y coagulación son procesos estrechamente relacionados que regulan la formación y degradación de la fibrina. La fibrinolisis o disolución de los coágulos de fibrina es uno de los mecanismos más importantes al prevenir el depósito de fibrina en la vasculatura e impedir la obstrucción al flujo sanguíneo. La enzima central en el mecanismo fibrinolítico es la plasmina, derivada de un zimógeno plasmático . el plasminógeno.

La molécula de plasminógeno es una glicoproteína de 92 Kd contiene 791 aminoácidos. Dentro de su estructura posee 5 kringles (o regiones estructurales), el módulo catalítico y una secuencia aminoterminal de 67 aminoácidos con un ácido glutámico en posición aminoterminal. El plasminógeno nativo tiene un ácido glutámico como grupo aminoterminal por lo que se le denomina Glu-plasminógeno, el cual se transformando a Lis-plasminógeno por acción de la plasmina cambiando su aminoterminal por una Lisina

En la molécula del plasminógeno, la particularidad de los kringles es la de poseer estructuras específicas llamadas sitios de fijación a la lisina encontrándolos en el kringles 1 y otro en el kringles 4. Estas estructuras permiten al plasminógeno fijarse a los residuos lisina en posición carboxi-terminal de la fibrina o de proteínas de la membrana celular.

La molécula de t-PA (Activador tisular del plasminógeno), es una glicoproteína de masa molecular de 70 Kd producida por las células endoteliales. Esta molécula está constituida por un módulo finger que reacciona con una secuencia peptídica de la cadena alfa de la fibrina y permite su fijación a la superficie del coágulo, dos módulos kringles, de los cuales el kringles 2 reconoce residuos de lisina presentes en la superficie de la fibrina y un módulo catalítico

Por lo cual al formarse un coágulo en el espacio intravascular el plasminógeno y el t-PA se fijan a la superficie de la fibrina. El plasminógeno se fija por interacción de los modelos kringles, y el t-PA por interacción del módulo finger.

La transformación del plasminógeno en plasmina es el resultado de una hidrólisis peptídica, la plasmina es de este modo formada directamente en la superficie de la fibrina, degradándola mediante hidrólisis peptídicas

## **MECANISMOS DE CONTROL DEL SISTEMA**

### **DE COAGULACION**

Al lesionarse un vaso inmediatamente se forma el coágulo de fibrina. Normalmente el coágulo no se extiende a lo largo del lumen del vaso ni tampoco lo ocluye. La formación del coágulo ocurre y se mantiene sólo donde y cuando es necesario. Con el tiempo, el coágulo se reemplaza por tejido conectivo. El plasma contiene agentes que inhiben la actividad de algunos factores hemostáticos y de las enzimas fibrinolíticas. Por cuestiones prácticas solo se mencionaran los inhibidores evaluados en el presente estudio.

#### **Regulación sobre la actividad y función de la trombina.**

La trombina es una enzima ("serpina"), que actúa sobre múltiples sustratos. Principalmente sobre el fibrinógeno para formar la fibrina. Factor XIII que estabiliza el polímero de la fibrina, activa factores V, VIII y XI, además de participar en la fibrinólisis y en la activación plaquetaria como inductor de la agregación plaquetaria. Por otra parte La Antitrombina III (AT-III) es el inhibidor más importante de la trombina. La AT III, es una glicoproteína, cuya acción sobre la trombina, depende de la unión de su sitio activo (arginina-393) sobre el sitio serina de la trombina. Así se forma el complejo trombina-antitrombina III (TAT), que es inactivo e irreversible, aunque también inhibe a los factores XIIa, XIa, Xa, IXa, calicreína y plasmina. La heparina acelera el efecto anticoagulante de la AT-III.

El Cofactor II de la heparina es una que inhibe selectivamente a la trombina formando un complejo con ella. Al igual que la AT-III, su actividad aumenta en presencia de heparina, sin embargo no inhibe a otros factores activados.

Sistema de la proteína C/proteína S.

La proteína C (PC) es una proteasa de síntesis hepática, pertenece al grupo de las proteínas dependientes para su carboxilación de la vitamina K. Posee 2 cadenas, una pesada donde se encuentra el sitio activo y una liviana. La trombina es el activador de la PC por medio de un cofactor situado en la superficie

endotelial denominado trombomodulina (Tm) con el cual forma un complejo. La Tm endotelial unida a la trombina activa la proteína C (PCa) esta se une a su cofactor, la proteína S (PS), que le permite unirse a las superficies celulares inhibiendo a los FVa y VIIIa; Inhibe la actividad procoagulante de las plaquetas e incrementa la actividad fibrinolítica al inhibir al inhibidor del t-PA.

La proteína S (PS) es el cofactor necesario para la acción de la PCa, es una glicoproteína vitamino-K dependiente de una sola cadena polipeptídica. La PS se encuentra en el plasma bajo dos formas: una forma libre y una forma unida a la proteína del sistema del complemento "la proteína de unión C4" (C4bp), sin embargo solo la forma libre es activa como cofactor de la PCa, favoreciendo su fijación a los fosfolípidos plaquetarios

Cuadro No.2

Características de algunas proteínas reguladoras del sistema de la coagulación

Inhibidores	Características	Peso Molecular	Síntesis	Acción	Tipo de * actividad
Antitrombina III	Glicoproteína	58 Kd	Hígado	FIIa, FXIIa, FXIa, FIXa, FXa	Serpina
Proteína C	glicoproteína Vit.K dependiente	62 Kd	Hígado	FVa, FVIIIa	Serpina
Proteína S	Glicoproteína Vit.K dependiente	70 Kd	Hígado	Unión a PCa	Cofactor
Cofactor II Heparina	Glicoproteína	66 Kd	Hígado	Trombina	Serpina

\*Los inhibidores de la coagulación también pueden dividirse de acuerdo a la presencia de ciertos dominios sobre sus moléculas como los inhibidores tipo Kunitz y los inhibidores tipo "Serpina" que neutralizan la actividad de los factores de coagulación que son proteasas de serina.

"Proteasa de serina" enzima que en su sitio activo catalítico tiene un residuo aminoácido de serina necesario para su actividad proteolítica.

## INHIBIDORES FIBRINOLITICOS

*Inhibición de la plasmina* El inhibidor específico de la plasmina es la  $\alpha_2$ -antiplasmina, proteína monomérica de masa molecular de 70 Kd, que forma con la plasmina un complejo. La inhibición de la plasmina liberada durante el proceso

fibrinolítico hacia el plasma constituye un mecanismo de control eficaz que impide la degradación excesiva del coágulo hemostático.

**Regulación de la actividad del t-PA (Activador tisular del plasminógeno)** La regulación de la actividad del t-PA es uno de los principales mecanismos de control de la fibrinólisis. La regulación a este nivel es debida no solamente a la escasa actividad enzimática del t-PA en ausencia de fibrina, sino también a la presencia en la circulación de un inhibidor específico, el Inhibidor del activar del plasminógeno tipo I (PAI-I). El t-PA forma un complejo con el PAI-I. esto implica que al formarse la fibrina en el espacio intravascular, se da un fenómeno de competencia entre la fibrina y el PAI-I por la fijación del t-PA

## SISTEMA HEMOSTÁTICO EN EL RECIÉN NACIDO

Aunque el conocimiento del desarrollo del sistema hemostático en el recién nacido no es bien conocido, se sabe que algunas proteínas son sintetizadas desde la vida fetal temprana como la protrombina presente a partir de la 14 o 15 semana o como el fibrinógeno encontrado desde la 5 semana. Brandalise concluye que la evolución de los niveles de los factores de coagulación que se sintetizan en el hígado guarda una relación con la maduración de este órgano (16) no encontrándose paso de los factores de la coagulación de la madre hacia el producto, a través de la placenta (1,9), por lo que los niveles encontrados en el producto dependen de su capacidad de síntesis, siendo medibles cuantitativamente a partir de las 10 semanas de edad gestacional (1,16). Si bien el sistema hemostático del recién nacido es eficaz ya que no experimentan complicaciones hemorrágicas espontáneas (8,12), son más vulnerables a sufrir serias complicaciones hemostáticas por algún defecto congénito o adquirido comparado con los niños y adultos (1).

Los estudios reportados indican que el recién nacido presenta cambios únicos reflejo de la profunda influencia de la edad gestacional y edad postnatal en la funcionalidad y concentración de los componentes de la hemostasia (1,2,9,10,13), incrementándose gradualmente después del nacimiento. Por lo cual contar con rangos de la población en cuestión permitiría un correcto diagnóstico y oportuno tratamiento de complicaciones hemostáticas (1,2).

Sin embargo, las dificultades en la obtención de la muestra sanguínea y el reducido volumen de plasma disponible para medir los diferentes componentes hemostáticos, como lo indican algunos autores han contribuido a retardar la comprensión del desarrollo del sistema hemostático en el recién nacido. (1) así como lo complicado que resulta obtener muestras de prematuros completamente sanos al momento del nacimiento (3).

Aunque el gran avance tecnológico de los últimos años nos permite contar con micro técnicas, encontramos escasos reportes en la literatura que nos

proporcionen un mayor entendimiento del sistema hemostático en esta etapa de la vida.

## HEMOSTASIA

Los valores de las concentraciones de algunas proteínas de la coagulación durante la vida fetal están fundamentados en escasos reportados en la literatura

Cuadro No.3  
Factores de coagulación en fetos, recién nacidos y adulto (4)

Parámetro	Feto semanas 19-23 (n=20)	Fetos semanas 24-29 (n=20)	Feto semanas 30-38 (n=22)	R. nacidos (n=60)	Adulto (n=40)
PT	32.5 (19-45)	32.2 (19-44)	22.6 (16-30)	16.7 (12.0-23.5)	13.5 (11.4-14.0)
TTPa	168.8 (83-250)	154.0 (87-210)	104.8 (76-128)	44.3 (35-52)	33.0 (25-39)
TT	34.2 (24-44)	26.2 (24-28)	21.4 (17.0-23.3)	20.4 (15.2-25.0)	14.0 (12-16)
Factores I (g/l)	0.85 (0.57-1.50)	1.12 (0.65-1.65)	1.35 (1.25-1.65)	1.68 (0.95-2.45)	3.0 (1.78-4.5)
IIa(%)	16.9 (10-24)	19.9 (11-30)	27.9 (15-50)	43.5 (27-64)	98.7 (70-125)
VIIa (%)	27.4 (17-37)	33.8 (18-48)	45.9 (31-62)	52.5 (28-78)	101.3 (68-130)
IXa(%)	10.1(6-14)	9.9 (5-15)	12.3 (5-24)	31.8 (15-50)	104.8 (70-142)
Xa(%)	20.5 (14-29)	24.9(16-35)	28.0 (16-36)	39.6 (21-65)	99.2 (75-125)
Va(%)	32.1 (21-44)	36.8 (25-50)	48.9 (23-70)	89.9 (50-140)	99.8 (65-140)
VIIIa(%)	34.5 (18-50)	35.5 (20-52)	50.1 (27-78)	94.3 (38-150)	101.8 (55-170)
XIa(%)	13.2 (8-19)	12.1 (6-22)	14.8 (6-26)	37.2 (13-62)	100.2 (79-135)
XIIa(%)	14.9 (6-25)	22.7 (6-40)	25.8 (11-50)	69.8 (25-105)	101.4 (65-144)
PreC (%)	12.8 (8-19)	15.4 (8-26)	18.1 (8-28)	35.4 (21-53)	99.8 (65-135)
QAPM(%)	15.4 (10-22)	19.3 (10-26)	23.6 (12-34)	38.9 (28-53)	98.8 (68-135)

\*p<.05

+p < .01

Las pruebas de laboratorio de rastreo (TP, TTPa y TT), muestran una gran variabilidad. Esta variabilidad depende entre otras cosas de la edad gestacional, sin embargo existen diferencias cuando se comparan neonatos con edad gestacional similar.

Con respecto a la concentración en plasma de los factores de contacto (FXI, FXII, precalicreína (Prec) y quininógeno de alto peso molecular (QAPM), similar a los Vitamina-K dependientes se encuentran disminuidos al momento del nacimiento, aumentando gradualmente hasta valores aproximadamente a los del adulto a los 6 meses de vida (1,3) Mientras que las concentraciones de fibrinógeno, FV y FVIII se reportan similares o ligeramente aumentados a los valores del adulto (3.1) Ver cuadro No.4

Cuadro No. 4

Valores de inhibidores de la coagulación en recién nacidos de pretérmino y término Durante los primeros 6 meses de vida

TERMINO						
Inhibidor	Día 1	Día 5	Día 30	Día 90	Día 180	ADULTO
AT III (U/ml)	0.6	0.6	0.78	0.97*	1.04 *	1.05
$\alpha$ 2M (U/mL)	1.39	1.48	1.50	1.76	1.91	0.86
Proteína C (U/mL)	0.35	0.42	0.43	0.54	0.59	0.96
Proteína S (U/mL)	0.36	0.50	0.63	0.86 *	0.87*	0.92
PRETERMINO (30-36 semanas)						
Inhibidor	Día 1	Día 5	Día 30	Día 90	Día 180	ADULTO
AT III (U/ml)	0.38+	0.56	0.59	0.83	0.90	1.05
$\alpha$ 2M (U/mL)	1.10+	1.25	1.38	1.80	2.09	0.86
Proteína C(U/mL)	0.28+	0.31	0.37+	0.45 +	0.57	0.96
Proteína S (U/mL)	0.26+	0.37	0.57	0.76 +	0.82	0.92

Estos valores representan los promedios encontrados (25)

\* Valores que no muestran diferencia con respecto al adulto.

+ Valores que muestran diferencia con los valores del recién nacido a término.

AT III, Antitrombina III;  $\alpha$ 2M,  $\alpha$ 2- macroglobulina.

La concentración de trombina encontrada en neonatos de término es 50% menor que en el plasma del adulto sano (4,6,13), sus inhibidores: antitrombina III (AT III) y heparina cofactor II, se encuentran disminuidos al nacimiento (4). siendo similar a los adultos heterocigotos quienes desarrollan complicaciones tromboticas espontáneas (1) La concentración de AT III y HCII son aproximadamente el 50% del valor del adulto (7). La concentración de un 3er inhibidor de la trombina la  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2M), en cambio se encuentra elevado al momento del nacimiento y hasta el fin de la infancia (1), siendo el mayor inhibidor de Trombina durante la vida fetal (8)

La concentración de proteína C esta disminuida al nacimiento (2) con niveles usualmente menores que los reportados en adultos heterocigotos deficientes (1,6). se reporta que la proteína C existe en una forma fetal al nacimiento (1). El significado fisiológico de la Proteína C fetal aún no es claro. Abad y col.. midieron la cantidad de proteína C antigénica en recién nacidos a término encontrando un promedio de 41.38% planteando, que dado que la antitrombina III y la proteína C se sintetizan en el hígado, su nivel guarda relación con el grado de madurez de este órgano (16)

En cuanto a la proteína S se reportan bajos niveles al nacimiento(14). Gilabert y col. Encontraron que la concentración de proteína S en el recién nacido a término corresponde al 45% de la cifra total del adulto, pero en éste un 60% circula unido a la proteína ligadora del complemento C4bp, en el recién nacido este porcentaje es menor. porque tiene una cantidad más baja de proteína C4bp, lo que da lugar a un incremento relativo de la funcionalidad de la proteína S. (16)

## SISTEMA FIBRINOLITICO

En la literatura se reportan concentración de plasminógeno en el recién nacido a término, equivalente al 50% de la encontrada en el adulto sano (1,9.13). presentando una hipoplasminogenemia (10) aproximadamente hasta los 6 meses de edad (20). Ver tabla 3. Anteriormente se pensaba que el plasminógeno en el recién nacido podría ser disfuncional, Corrigan y col , Concluyen que la generación de plasmina es dependiente de la concentración de plasminógeno y no indicativo de plasminógeno disfuncional en el recién nacido Martín Ries y col. (9.10) mencionan diferencias en la cantidad de ácido siálico y manosa en el plasminógeno del recién nacido. como una disminución en su actividad enzimática y una menor unión a células receptoras del plasminógeno fetal (1,9.10)

Cuadro No 5

Valores de los componentes del sistema fibrinolítico en recién nacidos de término y pretérmino durante los primeros 6 meses de vida

TERMINO						
Sistema fibrinolítico	Día 1	Día 5	Día 30	Día 90	Día 180	Adulto
Plasminógeno (U/mL)	1.95	2.17	1.98	2.48	3.24	3.36
t-PA (ng/mL)	9.60	5.60*	4.10*	2.10*	2.80	4.90
$\alpha$ 2AP (U/mL)	0.98	1.00*	1.00*	1.08*	1.11	1.02
PAI (U/mL)	6.40	2.30*	3.4*	7.20	8.10	3.6
PRETERMINO (30-36 SEMANAS)						
Sistema fibrinolítico	Día 1	Día 5	Día 30	Día 90	Día 180	Adulto
Plasminógeno (U/mL)	1.70+	1.91+	1.81	2.3	2.75+	3.3
t-PA (ng/ml)	8.48	3.97*	4.13*	3.31*	3.48*	4.96
$\alpha$ 2AP(U/mL)	0.78	0.81+	0.89+	1.06*	1.15	1.02
PAI-I (U/ml)	5.40*+	2.50 *	4.30 *	4.80*+	4.9 *+	3.60

Estos valores representan los promedios de los valores encontrados (25)

- Valores que no muestran diferencias frente a los del adulto
- + Valores que muestran diferencia a los del recién nacidos a término.

t-PA, Activador tisular del plasminogeno;  $\alpha$ 2AP,  $\alpha$ 2-antiplasmina; PAI-1, inhibidor del activador del plasminogeno.

Los niveles en plasma del activador del plasminógeno (t-PA) e inhibidores del activador del plasminógeno (PAI-1), según estudios de Asledt indican que son más altos en neonatos de término comparado con neonatos prematuros. reflejo de una maduración en la síntesis de proteínas (7). Sean encontrando niveles de  $\alpha$ 2-antiplasmina alrededor del 80% del valor del adulto (14,11). algunos otros reportes indican concentraciones similares a las del adulto (20,11).

Maureen Andrew reporta que los niveles de PAI-1 y t-PA. están significativamente aumentados por encima del valor del adulto (1) Por otra parte estudios realizados por Astedt y Lindoff indican una actividad moderadamente mayor de PAI-1 en niños de término comparado con neonatos prematuros. Estos resultados indican una capacidad fibrinolítica diferente al compararse niños de diferentes edades gestacionales (7)

Si bien. elevadas concentración de dímeros D puede ser indicativo de un global aumento en los procesos de hemostasia y fibrinólisis (5,18). a la vez elevados dímeros D y reducidos niveles de PAI-1 indican una elevada actividad fibrinolítica en el neonato al momento del nacimiento (5).

Respecta a los productos de degradación de fibrina-fibrinógeno (PDF). liberados del fibrinógeno o de la fibrina por el efecto de la plasmina. constituyendo fragmentos de diferente tamaño (X, Y, D, E). Un aumento en los niveles séricos de los PDF, es causado por una activación primaria del sistema fibrinolítico como en pacientes con enfermedades hepáticas. (16)

De manera global. si bien es cierto que en la etapa neonatal hay disminución de las proteínas procoagulantes también hay disminución correspondiente de sus inhibidores. para el caso de la fibrinólisis. es más complicado aún. pues aunque algunas proteínas activadoras o profibrinolíticas están en valores subnormales. otras están normales o inclusive disminuidas

## FASES EN EL ESTUDIO DE LA HEMOSTASIA.

El control metodológico de las variables que intervienen en la eficacia y eficiencia de las pruebas de hemostasia al momento de realizar un estudio permite proporcionar al clínico un resultado de laboratorio con alcances y limitaciones conocidos y controlados. Estas variables se dividen de acuerdo al momento en que se efectúa el procedimiento técnico.

FASES DE ESTUDIO DE LA HEMOSTASIA	
FASES DE ESTUDIO	VARIABLES QUE INTERVIENEN
Preanalítica	Paciente Toma de muestra
Análítica	Formato de estudios de laboratorio Reactivos Material Equipo
Postanalítica	Evaluación interna y externa de calidad Confrontación de las fases preanalíticas y analíticas

**1) FASE PREANALITICA.** En la etapa del estudio en el que se incluye las condiciones del paciente, solicitudes de laboratorio, así como la muestra sanguínea que influyen directamente sobre los resultados finales del estudio.

**a) Paciente** Incluyen el correcto registro de los datos generales del paciente: nombre completo, edad, sexo, diagnóstico(s), medicamentos que recibe, última dosis de medicamentos anticoagulantes, inhibidores de fibrinólisis o fibrinolíticos. Se recomienda que el paciente tenga un ayuno de cuando menos 8 horas en el momento de la toma de muestra sanguínea.

Sitio de punción vascular. Se debe elegir una vena de fácil acceso. La punción deberá ser limpia y de primera intención. La ligadura del brazo no deberá de

exceder de un minuto. El paciente deberá estar tranquilo y calmado. Se debe de registrar cuidadosamente el tipo de medicamento que recibe el paciente ya que existe una gran lista de fármacos que potencialmente pueden afectar el resultado de laboratorio.

**b) Muestra sanguínea** Las muestras de sangre deberán ser obtenidas de tal manera que se preserve la integridad de los factores de coagulación

**Recolección de la muestra** Los tubos de ensayo para la recolección de la muestra deberán de ser de vidrio siliconizado o plástico.

El anticoagulante de elección es citrato de sodio del 3.2 al 3.8% conservando la relación sangre/anticoagulante 9:1. La presencia de hemólisis en la muestra puede alterar los resultados obtenidos al liberar sustancias tromboplásticas al medio

**Manejo de la muestra.** La muestra puede permanecer a temperatura ambiente hasta una hora después de haberse recolectado, pero no más de 4 horas y separando el plasma conservándolo entre 4-6 grados centígrados. Si no se procesara la muestra en este lapso de tiempo deberá congelarse de inmediato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

FUENTES DE ERROR MÁS COMUNES EN LA FASE PREANALÍTICA	FUENTES DE VARIACIÓN DE RESULTADOS MÁS COMUNES
Flebotomía traumática	Plasma icterico
Ligadura prolongada	Plasma lipémico
Selección inapropiada del tubo con anticoagulante	Plasma hemolizado
Muestra sanguínea hemolizada	
Muestra sanguínea coagulada	
Interferencia con fármacos	
Retraso en la entrega de muestras al laboratorio	
Tubos erróneamente etiquetados.	

**c) Formato de estudio de laboratorio.** Se denomina a las características de la documentación impresa que proporciona la información necesaria para la organización y manejo administrativo del paciente, así como de los datos

relevantes que se deben de facilitar al laboratorio clínico para ser consideradas en el tipo de estudios, técnicos y procedimientos particulares para cada paciente.

**2) FASE ANALITICA.** Es la etapa que considera a las variables relacionadas con el procedimiento técnico en sí mismo que afectan los resultados finales del estudio del paciente.

**a)Material.** Se incluye pipetas, puntas de pipetas automáticas, tubos, celdas o pozos de reacción. De preferencia deberán utilizarse y desecharse, si esto no fuera posible asegurarse de contar con las medidas necesarias para su limpieza

**b)Equipo.** Se debe de seguir las instrucciones del fabricante en cuanto a calibración, mantenimiento y funcionalidad de los equipos del laboratorio de coagulación como son coagulómetros, espectrofotómetros, agregómetros, pipetas automatizadas, potenciómetros, incubadoras etc

Es fundamental tener por escrito el programa preventivo de mantenimiento del equipo, separado en las funciones que debe desarrollar el usuario y las actividades de la compañía que prestan los servicios

**c) Reactivos.** Los reactivos que se emplean en los estudios de hemostasia son de dos tipos: químicos y biológicos. Los primeros siguen las normas universales de preparación y estabilización, Los segundos siguen normas específicas, por lo tanto deberá atenderse los señalamientos del fabricante para su óptimo uso y conservación

Vigilancia del aspecto físico, temperatura de almacenamiento y fecha de caducidad de los reactivos. El pH y la fuerza iónica son controlados a través de los reactivos químicos, que incluyen el agua para la hidratación de los reactivos

### **FUENTES DE ERROR MAS COMUNES EN LA ETAPA ANALITICA**

\* Errores de transcripción

\* Falla en el seguimiento de las instrucciones en el uso de los reactivos y/o

equipo

- \* Falla en la adición de reactivos y/o plasma
- \* Falla en la calibración de equipo y pipetas.
- \* Errores en diluciones, cálculos y métodos

#### ***D) Evaluación interna de la calidad.***

Está basado en el uso de una hoja de control de registro diario (gráfica de Levey-Jennings) para obtener el control gráfico de la desviación estándar (DE) y calcular el coeficiente de variación (CV) de cada tipo de estudio que se realiza a través de un calibrador.

#### ***E) Evaluación externa de la calidad.***

Consiste en la evaluación de la precisión de los métodos empleados en los diferentes laboratorios, por medio del envío de muestras controladas de un Centro de Referencia

### **3) FASE POST-ANALITICA.**

Es la confrontación de todas las fases de análisis y tiene la finalidad de garantizar la calidad de los resultados los cuales deben ser confiables, oportunos y que representen el estado real del paciente. Debe ser realizado por el químico encargado del área y el médico tratante.

## MÉTODOS DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA

Dentro del estudio de los problemas clínicos de hemorragia y trombosis, se han incorporado un gran número de pruebas que permiten evaluar directa o indirectamente la función hemostática. El correcto entendimiento de dichas pruebas actuará positivamente en la evaluación de los pacientes al convertirse en una herramienta útil en el apoyo diagnóstico, seguimiento terapéutico y pronóstico.

Entre los métodos de instrumentación más reconocidos se encuentran los coagulométricos, cromogénicos, inmunoenzimáticos, aglutinación y nefelométricos.

### MÉTODOS COAGULOMÉTRICOS.

Estos métodos miden el tiempo que tarda en formarse un coágulo. Se utilizan tres tipos de instrumentos en coagulometría

a) **Fibrométricos**, los cuales se basan en la interrupción eléctrica al haber cambios en la fluidez del plasma a través de un sensor mecánico.

b) **Coagulómetros foto-ópticos**: que poseen un sensor foto-óptico que es sensible a los cambios de luz que se filtran al detectarse la formación del coágulo.

c) **Coagulómetros nefelométricos**. Al igual que los foto-ópticos mide la luz filtrada pero en un ángulo de 70 grados

**TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)**. Esta prueba valora la vía extrínseca. Mide la actividad del factor X por el complejo factor VIIa/FT, así como las reacciones restantes en la vía común. Por tanto, la prueba mide a los factores I, II, V, VII y X. En esta prueba se agrega al plasma una concentración de tromboplastina tisular (disponible comercialmente) necesaria para activar la vía extrínseca. Después de incubar se agrega Calcio y se mide el tiempo requerido para que se forme un coágulo

**TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL(TTP)** El TTP es la prueba de elección para evaluar la vía intrínseca. La prueba mide a todos los factores con excepción del VII y el XII. En esta prueba se incubaba una sustancia activadora como caolín, celite o ácido elálgico, con plasma para activar los factores de contacto. La activación del factor de contacto se continúa con la adición de fosfolípido sustituto de las plaquetas y calcio.

**TIEMPO DE TROMBINA (TT)** Es el tiempo que tarda un plasma citratado en coagular, al agregarle trombina en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica. Explora la conversión y función del fibrinógeno (23)

## **CUANTIFICACIÓN DE FACTORES**

Esta prueba permite conocer que factor o factores están afectados, así como su concentración plasmática.

Se basan en la determinación de los tiempos de coagulación de una serie de diluciones de un plasma de referencia (pool) a los que se ha añadido sustrato deficiente del factor en estudio y la tromboplastina correspondiente. Estas diluciones servirán para realizar una curva estándar en la que se interpolan los resultados del problema trabajado en las mismas condiciones.

## **CROMOGÉNICOS**

A diferencia de los métodos coagulométricos la reacción se mide por la liberación de un compuesto colorido que se mide fotométricamente: en una reacción de punto final o cinética.

Se mide la actividad del factor a estudiar enzimáticamente, haciéndolo actuar sobre un sustrato cromogénico. Los sustratos cromogénicos son péptidos sintéticos que contienen la estructura primaria de la molécula del sustrato original y que tiene unido una molécula de paranitroanilina en el sitio en el cual

actúa la enzima que se explora. Cuando se produce la reacción enzimática se libera la paranitroanilina (complejo aromático colorido), el color se mide a 450 nm de longitud de onda

Los métodos cromogénicos estudian la función de las enzimas de la hemostasia aunados a métodos cuantitativos nos permiten valorar si la alteración es debida a disfunción o disminución en la producción de las proteínas de la coagulación

## **ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS.**

Utilizan un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína en estudio, fijado en la fase sólida, este anticuerpo se une a la proteína en estudio y posterior a ello se agrega un segundo anticuerpo con la misma especificidad conjugado con una enzima (que puede ser la peroxidasa de rábano) al que posteriormente se le agrega un substrato específico (como el tetrametilbencidina) produciendo un producto colorido que es medido espectrofotométricamente. Este método no valora la función si no la concentración.

## **AGLUTININACIÓN**

Existen dos tipos de aglutinación. El método inmunológico que utiliza partículas de látex cubiertas con un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína en estudio que al ponerse en contacto con el plasma ó suero (que contiene antígeno) se formará una red de aglutinación. Esta reacción puede titularse para hacer el método semicuantitativo. Este método se usa ampliamente en la determinación de dímeros D-D y productos de degradación del sistema fibrinógeno-fibrina. El segundo método que es no inmunológico como por ejemplo el estudio del cofactor de la ristocetina en este se emplea plaquetas humanas rígidas (con formaldehído), se agrega Ristocetina y el suero o plasma problema (que contiene el Factor de von Willebrand). La Ristocetina actúa como cofactor del Von Willebrand que se une a la glicoproteína Ib de la membrana plaquetaria aglutinándolas. Se mide el tiempo que se tarda en observarse este fenómeno en una serie de diluciones o se mide la última dilución en donde persiste la

aglutinación. En cualquier caso se necesita de una curva estándar para interpretar los resultados del problema

### **CONTADOR ELECTRONICO DE PARTICULAS.**

**CUENTA DE PLAQUETAS (CP)** Es la cuantificación de plaquetas circulantes, empleando métodos manuales (Cuenta de frotis de sangre periférica, cuenta en cámara de Neubauer) o métodos automatizados (contador electrónico de partículas), que utiliza el principio de impedancia.

### **MORFOLOGIA PLAQUETARIA**

Se puede identificar la forma y estructura plaquetaria mediante métodos convencionales de microscopía de luz o microscopía electrónica.

### **VOLUMEN PLAQUETARIO.**

Se determina cuantitativamente durante el examen del frotis de sangre periférica o bien de manera reproducible mediante el mismo principio de impedancia que el contador electrónico

## METODOLOGIA

### LUGAR Y DURACION

Instituto Nacional de Perinatología

16 de Junio de 1998

18 de Febrero de 1999

### CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO

En relación a la muestra            Transversal

En relación al tipo de análisis    Descriptivo

En relación a la temporalidad    prospectivo

### UNIVERSO

Estuvo formado por todos los recién nacidos vivos en el Instituto Nacional de Perinatología

### UNIDADES DE OBSERVACION

Son todos los recién nacidos vivos entre 33.0 y 41.6 semanas de edad gestacional

### METODO DE MUESTRA

Selección consecutiva de casos que aplican los criterios de selección

## **VARIABLES EN ESTUDIO**

### *VARIABLES DEMOGRAFICAS*

Edad gestacional

Vía de nacimiento

Peso al nacer

Sexo

### *PRUEBAS PLAQUETARIAS*

Cuenta de plaquetas

Volumen plaquetario medio

### *INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN*

Proteína C

Proteínas S total

Proteína S libre

Antitrombina III

### *FIBRINOLISIS*

Plasminógeno

Dímeros D

Productos de degradación de la fibrina

Productos de degradación del fibrinógeno.

### *INHIBIDORES DE LA FIBRINA*

$\alpha$ 2-antiplasmina

PAI-I

## **DEFINICIO DE VARIABLES**

<i>Edad gestacional</i>	Es la contabilidad del periodo gestacional a partir de la fecha de la última menstruación, expresado en semanas.
<i>Peso al nacer</i>	Es la cuantificación del peso corporal, registrado al nacimiento, expresado en gramos.
<i>Recién nacido de pretérmino</i>	Se refiere al neonato con edad gestacional calculada por la fecha de última menstruación o el método de Capurro de 33.1 a 36.6 semanas
<i>Recién nacido a término</i>	Se refiere al neonato con edad gestacional calculada por la fecha de última menstruación o el método de Capurro de 37.0 a 41.6 semanas
<i>Vía de nacimiento</i>	Es el sitio de salida del producto de la concepción al término de la gestación, pudiendo ser por vía vaginal o mediante operación cesárea

### PRUEBAS PLAQUETARIAS

<i>Cuenta de plaquetas</i>	Es la cuantificación de plaquetas en una muestra de sangre total, anticoagulada, mediante un contador electrónico de partículas, se expresada en unidades de miles por milímetro cúbico.
<i>Volumen plaquetario medio</i>	Es la expresión matemática del promedio de lecturas gratificados en histograma, del volumen plaquetario, expresado en fentolitros.

## INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN

<i>Proteína C</i>	Es la proteína zimógena circulante que tiene la función de inhibir la actividad procoagulante de las plaquetas, del FVIII y FV, expresada en unidades Internacionales (UI).
<i>Proteína S total</i>	Es el cofactor necesario para la acción de la proteína C es vitamina K dependiente, se cuantifica por técnica de microELISA y mide todas las fracciones de la proteína. Se expresa en % de concentración.
<i>Proteína S libre</i>	Es el cofactor necesario para la acción de la proteína C es vitamina K dependiente, se cuantifica por técnica de microELISA y mide únicamente la fracción no unida a proteína, se expresa en % de concentración.
<i>Antitrombina III</i>	Es el inhibidor natural de las proteínas de la coagulación denominado cofactor de la heparina se expresa en unidades porcentuales.

## FIBRINOLISIS

Plasminógeno	Es la proteína inactiva o zimógeno circulante de la plasmina, se expresa en unidades porcentuales.
Dímeros D	Son los productos de la ruptura de la fibrina por efecto de la plasmina. Se expresa en ng/mL.
Producto de degradación de la Fibrina	Son los productos inespecíficos liberados durante la degradación de la fibrina por efecto de la plasmina, se expresa en ng/mL.

Productos de degradación del Fibrinógeno                      Son los productos inespecíficos liberados durante la degradación del fibrinógeno por efecto de la plasmina. se expresa en ng/mL.

#### *INHIBIDORES DE LA FIBRINOLISIS*

*α-2-antiplasmina*                      Es el inhibidor natural de la plasmina circulante se expresa en unidades porcentuales.

*PAI-I.*                                      Es el inhibidor del activador tisular del plasminógeno, se expresa en ng/mL

## RECOLECCION DE DATOS

En la unidad tocoquirúrgica se identificaron a las madres que consecutivamente ingresaron a la sala y que posteriormente sus hijos podrían servir para su inclusión en el estudio.

En la sala de tococirugía, se aplicaron los criterios de selección en el estudio. A los que fueron aceptados se procedió a la captura de los datos demográficos en una hoja de recolección de datos, se asignó su número de caso y posteriormente se procedió a la toma de muestra de sangre placentaria, puncionando a nivel de los vasos umbilicales, aspirando con sistema de tubos al vacío. Se recolectó un tubo de 0.5 con EDTA y 2 tubos con citrato de sodio al 3.8% (2.5ml/tubo), con volumen final de extracción de 5.5-6ml.

Las muestras se enviaron al laboratorio de hematología perinatal, debidamente rotuladas y con adecuado transporte de conservación de temperatura.

La sangre se separó mediante centrifugación y del plasma sobrenadante, se obtuvieron alícuotas y fueron congeladas hasta su procesamiento. Las pruebas que se realizaron se indican en la tabla No. 5

Tabla No 5  
Pruebas realizadas en el estudio

PRUEBA	TECNICA
<b>PRUEBAS PLAQUETARIAS</b>	
Cuenta de plaquetas	Contador electrónico de partículas
Volumen plaquetario medio	Contador electrónico de partículas
<b>INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN</b>	
Proteína C	ELISA
Proteína S total	ELISA
Proteína S libre	ELISA
Antitrombina III	Cromogénico
<b>FIBRINOLISIS</b>	
Plasminógeno	Cromogénico
Dímeros D	Inmunológico
Productos de degradación fibrina	ELISA
Productos de degradación Fibrinógeno	ELISA
<b>INHIBIDORES DE LA FIBRINOLISIS</b>	
$\alpha$ -2-antiplasmina	Cromogénico
PAI-I	Cromogénico

## PRUEBA PILOTO

La fase técnica fue valorada previamente con muestras de plasma adulto, sin embargo, para identificar posibles problemas en el proceso de la fase preanalítica y analítica en el estudio de recién nacidos, se recolectaron los primeros diez casos que sirvieron para validar la recolección de datos y manejo de las muestras de sangre.

## PLAN DE ANALISIS

### **Estadística descriptiva.**

Se obtuvieron para las variables con escala de medición cuantitativa de intervalo o razón los valores promedios, desvío estándar y en su caso intervalo de confianza del 95 %.

Para las variables nominales se obtuvieron las medidas de frecuencia (taza. razón)

### **Análisis estadístico.**

Ya que el objetivo se centró en describir los cambios en dos muestras independientes, con distribución no normal. Los valores del sistema fibrinolítico e inhibidores de la coagulación se agruparon por grupos de término y pretérmino y sea aplicó la prueba de la U de Mann Whitney, para establecer la independencia de dos grupos de valores con distribución no gaussiana.

Los grupos fueron estratificados de acuerdo a su grupo de edad gestacional (término y pretérmino), así como por descripción nominal de grupo de peso (<2500, 2500-3500 y > 3500 g), describiendo los valores de las variables dependientes y las nominales no modificables (sexo) y edad gestacional junto a las variables dependientes

Con la intención de conocer el peso específico de cada una de las variables independientes (género, peso y edad gestacional), con respecto a las variables dependientes, se utilizó el análisis de regresión de pasos sucesivos, para cada una de las variables dependientes

## ASPECTO ETICO

Investigación sin riesgo

## CONSENTIMIENTO DE PARTICIPANTES

No fue necesario por no existir riesgo alguno sobre los participantes, debido a que se recolectaron muestras de sangre placentaria

## RESULTADOS

Se estudiaron en total 57 recién nacidos, de los cuales 53 fueron recién nacidos a término y 4 pretérmino. La edad gestacional promedio en los recién nacidos a término fue de  $39.2 \pm 1.1$  semanas y de los pretérmino  $34.2 \pm 1.6$  semanas

El peso de los recién nacidos de término fue de  $3047 \pm 384$  g. y de los recién nacidos pretérmino de  $2035 \pm 213$  g

La distribución del género fue de 27 casos masculinos de los cuales 25 nacidos a término y 2 de pretérmino, 30 casos femeninos de los recién nacidos de los cuales 28 nacidos a término y dos de pretérmino

En cuanto a la vía de nacimiento 37 casos nacieron por cesárea de los cuales 34 fueron a término y 3 de pretérmino, 20 nacimientos por parto de los cuales 19 fueron de término y 1 de pretérmino (Cuadro No. 6).

Cuadro No. 6  
DATOS GENERALES DE LA MUESTRA

VARIABLE	TERMINO (n=53)	PRETERMINO (n=4)
Edad gestacional (semanas)*	$39.2 \pm 1.1$	$34.2 \pm 1.6$
Peso (g)*	$3047 \pm 348$	$2035 \pm 213$
Sexo masculino n	25	2
Sexo femenino n	28	2
Cesáreas n	34	3
Partos n	19	1

\*Promedio y desviación estándar

El número promedio de plaquetas fue de  $229 \pm 85$  mil  $\times$   $\text{mm}^3$  en los recién nacidos a término y  $180 \pm 101$   $10^3/\text{mm}^3$  en los pretérmino, no encontrándose una diferencia significativa al comparar los dos grupos de neonatos. Como tampoco se encontró diferencia significativa en los valores del Volumen plaquetario medio en los niños de término fue de  $7.1 \pm 1.5$  fentolitros y en los prematuros de  $6.9 \pm 0.6$  fentolitros (Cuadro No. 7).

Cuadro No.7  
**VALORES DE LAS PLAQUETAS Y VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO EN RECIEN NACIDOS DE TERMINO Y PRETERMINO**

PRUEBA	TERMINO (n=53)	PRETERMINO (n=4)	p <sup>x</sup>
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ ) x	229	180	NS
VPM (fL) X	7.1	6.9	NS

Valor p, calculado con U de Mann Whitney

x = promedio

VPM = Volumen plaquetario medio

En relación a los valores de las proteínas del sistema fibrinolítico e inhibidores de la coagulación, los promedios y desviación estándar se muestran en la Cuadro No 8

En cuanto a la Proteína C se encontró en los nacidos a término un valor de  $0.29 \pm 0.09$  (U/ ml) y de  $0.23 \pm 0.06$  en los nacidos a pretérmino encontrándose al comparar estos dos grupos una diferencia significativa de  $p=0.047$

Respecto a la Proteína S Total los valores encontrados fueron de  $36.8 \pm 9.7$  en los nacidos a término y de  $28.5 \pm 6.85$  en los nacidos a pretérmino encontrándose una diferencia significativa entre estos dos grupos de  $p=0.033$

En cuanto a la Proteína S libre se obtuvo valores de  $26.5 \pm 13.6$  en los nacidos a término y de  $23.5 \pm 8.06$  no encontrándose diferencia significativa al comparar estos dos grupos

Respecto al último de los inhibidores de la coagulación evaluados en este estudio La Antitrombina III se encontraron valores de  $41.55 \pm 14.22\%$  en los nacidos a término y  $25.07 \pm 6.68\%$  en los nacidos a pretérmino encontrándose una diferencia significativa de  $p=0.06$  al compararse estos dos grupos.

Con relación al Plasminógeno se obtuvieron valores de  $57.14 \pm 9.55\%$  en los nacidos a término y  $39.7 \pm 4.72\%$  en los nacidos a pretérmino encontrándose también una diferencia significativa de  $p=0.001$  entre ambos grupos.

En cuanto a los Dímeros D se encontraron valores de  $1339.6 \pm 4833.5$  ng/mL en los nacidos a término y  $625 \pm 946$  4ng/ml en los nacidos a pretérmino. no encontrándose una diferencia significativa entre ambos grupos.

Productos de degradación del fibrinógeno (  $587.09 \pm 1121.18$ ng/ml de término y  $310 \pm 311.65$ ng/ml pretérmino, sin diferencia significativa.)

En relación a los productos de degradación de fibrina fue de  $2076.29 \pm 3636.71$ ng/ml de término y  $1561 \pm 1379.63$  ng/mL pretérmino, sin diferencia significativa.

Respecto al  $\alpha_2$ -AP se encontraron valores de  $76.63 \pm 18.7\%$  en los nacidos a término y  $71.65 \pm 8.19\%$  en los nacidos a pretérmino, no encontrándose una diferencia significativa entre ambos grupos de neonatos

Y por último en el PAI-I los valores encontrados fueron de  $41.61 \pm 30.21$  ng/mL en los nacidos a término y  $44.86 \pm 28.92$  ng/mL en los nacidos a pretérmino. no encontrándose una diferencia significativa entre ambos grupos de neonatos

Con la intención de conocer el peso específico de cada una de las variables independientes (género, peso y edad gestacional), con respecto a las variables dependientes, se utilizó el análisis de regresión de pasos sucesivos, para cada una de las variables dependientes. (cuadro No. 9).

Se pudo observar que las variables dependientes que se tuvieron asociación estadísticamente significativa con las variables independientes fueron las siguientes. Los valores de proteína S total ( $p < 0.02$ ), antitrombina III ( $p < 0.04$ ) y plasminógeno ( $p < 0.001$ ), se asociaron significativamente con la edad gestacional ( $p < 0.02$ ). La dirección de esta asociación fue directamente proporcional, es decir, a mayor edad gestacional se observaron aumentos consecuentes en los valores plasmáticos de estas proteínas.

Finalmente los valores plasmáticos promedio de la proteína C, aumentaron en relación directamente proporcional con el peso al nacer ( $p < 0.02$ ).

En cuanto a la concentración de las proteínas del sistema fibrinolítico e inhibidores de la coagulación, en los recién nacidos estudiados, subdivididos en tres grupos de acuerdo al peso.  $< 2500$ , entre  $2500-3500$  g y mayor de  $3500$  g. Para el caso de la proteína C, a pesar de haber diferencia en la mediana de los valores obtenidos en cada grupo, la dispersión de los mismos hace que no exista diferencia entre sus resultados globales. Situación similar es la proteína S total, proteína S libre y antitrombina III

Para el sistema de la fibrinólisis, hay diferencia estadística en los valores de plasminógeno, mismos que aumentan conforme aumenta el peso corporal del neonato ( $p < 0.0003$ ). Se repite la situación de diferencias en las medias de los valores, con amplitud en los extremos, que impiden establecer la presencia de diferencia estadísticamente significativa en los casos de dímeros D, productos de degradación de fibrina/fibrinógeno, A2AP, PAI-I. Adicionalmente, este hecho también se observó en la cuenta de plaquetas y el volumen plaquetario medio (cuadro 10)..

Cuadro No.8  
**VALORES DE LAS PROTEINAS DEL SISTEMA FIBRINOLITICO E  
 INHIBIDORES DE LA COAGULACION EN RECIEN NACIDOS  
 DE TÉRMINO Y PRETÉRMINO**

PRUEBA	RN TÉRMINO (n 53)	RN PRETÉRMINO (n 4)	VALOR DE p*
Proteína C (U/mL)	0.29	0.23	0.047
Proteína S total (%)	36.8	28.5	0.033
Proteína S libre (%)	26.5	23.5	NS
Antitrombina III (%)	41.7	25.0	0.006
Plasminógeno (%)	57.1	39.7	0.001
Dímeros mg/dl	1339.6	625	NS
PDFg (ng/ml)	587.1	310	NS
PDFb (ng/ml)	2076.2	1561.7	NS
$\alpha$ 2-AP (%)	76.6	71.6	NS
PAI I (ng/ml)	41.6	44.9	NS

(Promedio)

ANALISIS DE REGRESION  
Cuadro No. 9

Variable dependiente	Variable independiente	F	t	P
Proteína C	Peso	5.3	2.3	0.02
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
Proteína S Total	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	5.7	2.3	0.02
Proteína S libre	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
Antitrombina III	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	4.4	2.1	0.04
Plasminógeno	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	12.1	3.4	0.001
Dímeros D	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
PDFg	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
PDFb	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
2-antiplasmina	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
PAI I	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
Plaquetas	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS
Volumen plaquetario medio	Peso	NS	NS	NS
	Sexo	NS	NS	NS
	Vía	NS	NS	NS
	EG	NS	NS	NS

Variables independientes, peso, sexo, vía y edad gestacional

VALORES DE LAS PROTEINAS DEL SISTEMA FIBRINOLITICO  
E INHIBIDORES DE LA COAGULACION POR GRUPOS DE PESO  
Cuadro No. 10

PRUEBA	Grupo I (<2500 g)	Grupo II (2500-3500)	Grupo III (> 3500)	Valor de p*
Casos (n)	8	44	5	
Edad gestacional (semanas)	36.3 (35.3-37.3)	39.1 (38.6-39.5)	39.4 (38.1-40.6)	
Proteína C (UI/mL) (semanas)	0.23 (0.17-0.30)	0.28 (0.25-0.30)	0.36 (0.27-0.45)	NS
Proteína S total (%) (semanas)	32.8 (26-39.6)	38 (35-40)	28.6 (20-37.1)	NS
Proteína S libre (%) (semanas)	24.62 (15.2 - 33.9)	27.6 (23.5 - 31.7)	18 (6.1 - 29.8)	NS
Antitrombina III (%) (semanas)	33 (22 - 44)	41 (37 - 45)	43 (37 - 45)	NS
Plasminógeno (%) (semanas)	43 (36 - 49)	58 (55 - 50)	52 (44 - 60)	0.0003
Dimeros D (ng/mL) (semanas)	625 (0 - 4000)	1431 (0 - 3000)	600 (0 - 5000)	NS
PDFg (ng/mL) (semanas)	322 (0 - 1277)	729 (313 - 11127)	236 (0 - 1444)	NS
PDFb (ng/mL) (semanas)	1287 (0 - 3802)	2314 (1242 - 3386)	831 (0 - 4012)	NS
a2-antiplasmina (%) (semanas)	79 (57 - 83)	78 (72 - 83)	70 (54 - 86)	NS
PAI I (ng/ml) (semanas)	36 (11 - 61)	43 (33 - 53)	31 (33 - 67)	NS
Plaquetas 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> (semanas)	187 (126 - 249)	234 (207 - 260)	219 (142 - 297)	NS
VPM (FL) (semanas)	7.4 (6.4 - 8)	6.9 (6.5 - 7.4)	8 (6.7 - 9.3)	NS

Valor de p. calculado con U de Mann Whitney

Valores promedio y amplitud.

PDFg. productos de degradación del fibrinógeno.

PDFb. productos de degradación de la fibrina

PAI. inhibidor del activador del plasminógeno.

## DISCUSION

La concentración de proteínas del sistema hemostático del recién nacido presenta diferencias y similitudes al compararse con el adulto (1,2,9,10). Los componentes del sistema hemostático son sintetizados en la vida fetal temprana y no atraviesan la placenta (1,9). Los estudios realizados indican que el recién nacido presenta cambios únicos reflejo de la profunda influencia de la edad gestacional y edad postnatal de los componentes de la hemostasia (1,2,9,10,13).

El conocimiento del desarrollo normal del sistema de coagulación humano es esencial para investigar problemas trombóticos y hemorragias en el recién nacido. Contar con rangos de la población en cuestión permitiría un correcto diagnóstico y oportuno tratamiento de complicaciones hemostáticas. El problema aumenta por la dificultad de obtener adecuadas muestras sanguíneas, el tamaño pequeño de las muestras sanguíneas que puede ser tomada y la necesidad del uso de micro técnicas para realizar múltiples estudios.

Tabla 11

### Comparación de los resultados encontrados en la población neonatal estudiada y los valores reportados en el adulto

Prueba	Termino (n=53)	pretérmino (n=4)	Adulto* valores
	x	x	
Proteína C (U/mL)	0.29	0.23	0.96
Proteína S total (%)	36.8	28.5	65-110
Proteína S libre (%)	26.5	23.5	30-60
Antitrombina III (%)	41.75	25.07	80-120
Plasminógeno (%)	57.14	39.7	75-128
Dímeros D (ng/mL)	1339.62	625	20-400
Productos de degradación de la fibrina (ng/mL)	2076.29	1561.75	
Productos de degradación del fibrinógeno (ng/mL)	587.09	310	
PAI I	41.61	44.86	10-100
$\alpha$ 2-Antiplasmina	76.53	71.65	88-114

X = promedio

\*(4)

En la literatura encontramos que Abad y col (1), midieron la cantidad de Proteína C en recién nacidos de término, encontrando un promedio de 41.38% y plantearon que dado que la Proteína C, así como una gran parte de las proteínas de la coagulación se sintetizan en el hígado su nivel guarda relación con el grado de madurez de éste órgano. En nuestros resultados encontramos niveles más bajos de Proteína C y al comparar ambos grupos de neonatos encontramos una diferencia significativa obteniendo valores más bajos de Proteína C en los neonatos nacidos a pretérmino.

En la Proteína S total, se encontraron valores bajos con relación a adulto así como lo una diferencia significativa al comparar ambos grupos de neonatos lo cual se relaciona con el grado de madurez del hígado en esta etapa de la vida reporta la literatura revisada. Gilabert y col. Encontraron que la concentración de Proteína S en el recién nacido a término corresponde al 45% de la cifra total del adulto, pero que mientras en éste un 60% circula unida a la proteína ligadora del complemento (C4bp), en el recién nacido este porcentaje es menor porque tiene una cantidad más baja de proteína C4bp, lo que da lugar a un incremento relativo de la funcionalidad al estar en forma libre. (16) En nuestros resultados al comparar los valores de Proteína S libre entre los dos grupos de neonatos no se encontró una diferencia significativa ni tampoco se encontró un % de diferencia importante al compararse con los valores reportados en el adulto lo cual correlaciona con lo descrito por Gilabert y col.(16)

Los valores de plasminógeno encontrados son valores bajos con respecto a los del adulto, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (1,9,13), en los cuales mostraron que la hipoplasminogenemia es debida a una síntesis reducida y no a la activación y consumo de la proteína. Nosotros encontramos una diferencia significativa en los valores de plasminógeno entre los dos grupos de neonatos en

estudio encontrando valores más bajos en los niños prematuros que en los nacidos a término y en niños de bajo peso para su edad gestacional.

La Antitrombina III (AT III) es una glicoproteína de síntesis hepática no vitamino K dependiente (16), reportándose concentraciones de AT III aproximadamente al 50% del valor de adulto sano en la literatura. En este estudio se encontraron valores más bajos de AT III en niños de pretérmino comparado con los nacidos a término con una diferencia significativa siendo ambos menores que los valores registrados en el adulto, debido a la madurez hepática propia del recién nacido.

Respecto a los Dímeros D no se encontraron diferencia significativa al compararse los dos grupos de neonatos pero si se encontraron mas elevados al comparar los con los del adulto en los dos grupos de neonatos estudiados, lo cual se explica por los cambios ocurridos durante el nacimiento por un aumento global en la actividad del sistema de coagulación y fibrinolítico.

Así mismo también se encontró aumento en la concentración en los productos de degradación de la fibrina y del fibrinógeno, al compararlos que se pueden relacionar con el fenómeno fisiológico antes mencionado, siendo indicativos de un aumento en la actividad fibrinolítica.

Los resultados muestran niveles de PAI elevados con respecto a los valores en el adulto. Los incrementos del PAI-I en recién nacidos en el primer día de vida podrían estar explicados por la liberación del PAI-I del endotelio prontamente después del nacimiento.

En los demás parámetros evaluados no se encontró diferencia significativa al comparar las dos poblaciones de neonatos (plaquetas, VPM).

## ***Bibliografía***

- 1.- Andrew M. The Relevance of Developmental hemostasis to hemorrhagic Disorders of Newborns. *Sem Perinatol* 1997; 21: 70-85.
- 2.- Schneider Dirk M., Georg-Friedrich V. Tempelhoff, Britta H. And Lothar H. Maternal and cord Blood hemostasis at delivery. *J Perinat Med* 1997;25:55-61.
- 3.- Reverdiau-Moalic, B. Delahousse, G. Dody. Evolution of Blood Coagulation Activators and Inhibitors in the healthy human Fetus. *Blood* 1996;88:900-906
- 4.- Patel P, Weitz J, Brooker LA, Mitchel L, Andrew M. Decreased Thrombin Activity of Fibrin Clots prepared in Cord Plasma Compared with Adult Plasma. *Ped Res* 1996;39:826-830
- 5.- Knofler R, Hofmann S, Weissbach G, Eberhard K, Bernhard N, Nachtrodt G. Molecular Markers of the Endothelium the Coagulation and the Fibrinolytic Systems in Healthy newborns. *Sem Throm & Hemosta* 1998;24:453-460
- 6.- Dati F, Pelzer H, Wagner C. Relevance of Markers of hemostasis Activation in Obstetrics/Gynecology and Pediatrics. *Sem Throm & Hemosta*. 1998;24:443-448.
- 7.- Astedt B, Lindoff C. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in plasma of premature and term newborns. *Acta Paediatr* 1997; 86:11-13
- 8.- Maurtha AP, Boggess KM, Jimmerson CE, Greig PC, Herbart WN. Umbilical venous D-dimer concentration with and without Labor. *Obstet & Gynecol* 1998;92:184-186
- 9.- Ries M, Klinge J, Rauch R, Keuper H, Harms D. The Role the alpha 2 Antiplasmin in the inhibition of clot Lysis in Newborns and Adults. *Biol Neonate* 1996;69:298-306

- 10.- Ries M. *Molecular and Functional. Properties of Fetal Plasminogen and its Possible influence on clot Lysis in the Neonatal Period.* *Sem Thromb & Hemosta* 1997;23:247-252
- 11.- Berkner KL, Pudota N. Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase . *Proc Natl Acad Sci Biochem* 1998;95:446-471
- 12.- Mautone A, Giodano P, Montagna A, Quercia M, Altomare M, De Mattia D. Coagulation and fibrinolytic systems in the ill preterm newborn. *Acta Paediatr* 1997;86:1100-1104
- 13.- Roumans M, Hubert JM, van Wers JWJ. Hemostasis in newborns of smoking and nonsmoking mother *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:662-666
14. Astedt B. Antenatal Drugs Affecting Vitamin K Status of the Fetus and the Newborn. *Sem Thromb & Hemosta* 1995;21:364-370
- 16.- Martínez Murillo C, Quintana González S. *Manual de Hemostasia y Trombosis.* Editorial Prado 1996, Capítulos 2-6.
- 17.- Lobato ME: Mecanismos de la Hemostasia. En Abreu LM, *Compendio de Medicina General.* Mexico Editorial Mendez. Segunda edición . 1997; Vol. I: 25-28
- 18.- Nathan DG, Stuart H. *Hematology of infancy and Childhood* ED. W. B. Saunders Company Vol.2, Capítulos 41 y 42.
- 19.- Sakuragawa N. Regulación of Trombosis and Hemostasis by antithrombin. *Semin Tromb & Hemosta* 1997;23:557-562
20. Nako Y, Ohki Y, Harigaya A, Tomomasa T. Plasma Thrombomodulin level in very low birthweight infants at birth. *Acta Paediatr* 1997;86:1105-109.

21. Xu Ling, M, Berry L, Fred O, Lesley M, Bosco P, Maureen A.  $\alpha_2$ - Macroglobulin Remains as Important as Antithrombin III for Thrombin Regulation in Cord Plasma en the Presence of Endothelial Cell Surfaces. *Pediatric Research* 1995;37:373-78
22. Soo Il Chung, Soo Young Lee, Ryogin Uchino and Franco Carmassi. Factors That Control Extravascular fibrinolysis. *Sem Tromb & Hemosta* 1996;22:479-88
23. Ruiz Argüelles GJ . *Fundamentos de Hematología*. Editorial Medica Panamericana. 2a. Edición 1998;264-288
24. McKenzie S.B. *Hematología Clínica*. Editorial Manual Moderno 2a. Edición,2000 Capítulos 23-27.
25. Andrew M, Paes B. Development of the hemostatic System in the Neonate and Young Infant. *J Pediatric Hematology/Oncology* 1990,12:95-104